

## 明細書

## 新規ガラクトース転移酵素、そのペプチド及びこれをコードする核酸

技術分野

本発明は、新規ガラクトース転移酵素、および該酵素をコードするポリヌクレオチド、並びにこれら分子の用途に関する。

背景技術

複合糖質には、糖タンパク質と糖脂質がある。糖タンパク質には、ペプチドの種類と糖の結合様式によってN結合型糖鎖（アスパラギン結合型糖鎖）とO結合型糖鎖（ムチン型糖鎖）とプロテオグリカンの3種類に大別される。O結合型糖鎖は、セリンおよびスレオニンにO-グリコシド結合を介して糖が転移される。その糖の種類は、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が主であるが、フコース(Fuc)、マンノース(Man)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)なども転移される。これらの糖がまずペプチドに転移して、さらに様々な糖転移酵素によってO結合型糖鎖が伸長していく。最初に転移される糖がGalNAcの場合、2番目および3番目の糖の種類、結合様式の違いによって、異なるコア構造が形成される。8種類のコア構造の存在が知られており、その構造は図7に示す。コア1構造(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-ペプチド)は、別名 Thomsen-Friedenreich 抗原とも言われており、生体内のほとんどの組織および細胞で発現している。この抗原は Tn 抗原(GalNAc $\alpha$ 1-ペプチドや STn 抗原(シアリル Tn 抗原(NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-ペプチド))と共に乳癌、膀胱癌、大腸癌などで癌関連糖鎖抗原として有名である。このコア1構造の生合成に必要なコア1 $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素(GalNAc $\alpha$ 1-ペプチドのGalNAcに $\beta$ 1,3結合でガラクトースを転移する酵素)が、IgA腎症やTn症候群などの疾病において何らかの理由で酵素活性低下あるいは欠損している報告が

多数存在する。

このようにガラクトース転移酵素の異常は、種々の疾患と関連しており、病因の解明、治療法の開発にとって、ガラクトース転移酵素についての解析が望まれていた。また、新規なガラクトース転移酵素を同定することができれば、さらなる該酵素と疾病との関連性を明らかにできるものと期待される。

### 発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、新規ガラクトース転移酵素を同定することにある。

また、本発明は、このようにして同定された新規ガラクトース転移酵素の用途を提供することをも目的とする。新規ガラクトース転移酵素の好ましい用途の一つの態様として、該酵素の変異や発現異常を指標とした、該酵素に起因する疾患の検査方法を提供する。さらに、該酵素の活性を指標とすることにより、該酵素に起因する疾患の治療のための候補化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明者らは、上記課題を解決するため、まず、既知のガラクトース転移酵素 ClGal-T1 をクエリーとして公共のデータベース検索を行い、ヒットした DNA 配列を基に、cDNA ライブラリーからの新規ガラクトース転移酵素のクローニングを試みた。サンプルとして常法 (Yuzuru Ikehara, Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999) により作製したヒト大腸腺癌細胞株 Colo205 cDNA ライブラリーを用いた。スクリーニング手法はラジオアイソトープを使用した一般的な核酸プローブによる方法を用いた。

プローブとハイブリダイゼーションする単一のプラークを拾い、ファージを回収した後、pBluescript SK-ベクターに挿入された cDNA クローンとして調製した。次いで、該 cDNA クローンの塩基配列を決定した。該 cDNA は、957bp の ORF となり、318 アミノ酸をコードすることが判明した。該 ORF によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列とクエリーに使用した ClGal-T1 のアミノ酸配列は、3

0%未満のホモロジーしか持たず、本発明者らはこのタンパク質を「C1Gal-T2」と名付けた。アミノ酸配列の解析から、ほとんどの糖転移酵素に見られる典型的な2型の膜タンパク質であることが示唆された。

また、C1Gal-T2の受容体基質の探索を行ったところ、pNp- $\alpha$ -GalNAcに対し強い反応が示され、pNp- $\beta$ -GalNAcに対し反応しないことから、C1Gal-T2はコア1糖鎖(ガラクトース $\beta$ 1-3アセチルガラクトサミニル $\alpha$ 1-R)の合成酵素であることが示唆された。

さらに本発明者らはガラクトースとN-アセチルガラクトサミニル $\alpha$ 1-Rとの結合様式について解析を行った結果、C1Gal-T2は、細胞内においてもCore1合成酵素であることが示された。

また本発明者らは、コア1合成酵素を持たない細胞株(LSCおよびJurkat)を用いて、C1Gal-T1および本発明者らによって見出されたC1Gal-T2について遺伝子発現解析を行った。その結果、LSCおよびJurkat細胞株では、C1Gal-T2が不活性型であるために、コア1合成活性を示さないことが判明した。また、C1Gal-T1はmRNAの発現があるにもかかわらず酵素活性を検出できなかったことから、C1Gal-T2がより比活性の強いコア1合成酵素であることが示唆された。

さらに本発明者らは、同定されたC1Gal-T2をクエリーにしてデータベース検索を行い、アミノ酸配列レベルで約68%の相同性を有するタンパク質を見出した。該タンパク質をコードする遺伝子は、これまでのところ、そのゲノム配列情報しか知られていない。本発明者らはこの配列をC1Gal-T3と名付けた。そして本発明者らは、このC1Gal-T3がガラクトース転移酵素活性を有することを見出した。

上記の如く本発明者らは、新規なガラクトース転移酵素(ガラクトース転移活性を有するタンパク質)C1Gal-T2およびC1Gal-T3を同定することに成功し、本発明を完成させた。ガラクトース転移酵素は、生体内で重要な機能を有すると考えられ、その発現や機能の異常は、種々の疾患の原因となり得る。このため、同

定されたガラクトース転移酵素の活性または発現を指標とすることにより、このような疾患の検査を行うことも可能である。同定された新規ガラクトース転移酵素やそれらをコードするポリヌクレオチドは、これら疾患に対する好適な治療薬となるものと期待される。

本発明は、新規なガラクトース転移酵素およびその遺伝子、並びにそれらの製造及び用途に関し、より詳しくは、

〔１〕 下記（ａ）または（ｂ）に記載のポリヌクレオチド、

（ａ）配列番号：２または１９に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（ｂ）配列番号：１または１８に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

〔２〕 ガラクトース転移活性を有する、下記（ｃ）または（ｄ）に記載のポリヌクレオチド、

（ｃ）配列番号：２または１９に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（ｄ）配列番号：１または１８に記載の塩基配列からなる DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

〔３〕 配列番号：２または１９に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチド、

〔４〕 〔１〕 から〔３〕 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

〔５〕 〔１〕 から〔３〕 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは〔４〕 に記載のベクターを保持する宿主細胞、

〔６〕 〔１〕 から〔３〕 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

〔７〕 〔５〕 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、

產生させたポリペプチドを回収する工程を含む、〔6〕に記載のポリペプチドの製造方法、

〔8〕 〔6〕に記載のポリペプチドに結合する抗体、

〔9〕 〔6〕に記載のポリペプチドの活性または発現を増加させる必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記（a）から（c）に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物、

（a）〔1〕から〔3〕のいずれかに記載のポリヌクレオチド

（b）〔4〕に記載のベクター

（c）〔6〕に記載のポリペプチド

〔10〕 〔6〕に記載のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記（a）または（b）に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物、

（a）〔8〕に記載の抗体

（b）生体内において、内因性の〔6〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチド

〔11〕 〔6〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または〔6〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニング方法であって、

（a）被験化合物と〔6〕に記載のポリペプチドとを接触させる工程、

（b）〔6〕に記載のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を測定する工程、

（c）被験化合物を接触させない場合と比較して、ガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔12〕 〔6〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または〔6〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子またはその発現制御領域の変異を検出することを含む方法、

〔13〕 以下の（a）～（d）の工程を含む、〔12〕に記載の検査方法、

（a）被検者から DNA 試料を調製する工程

（b）〔6〕に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を単離する工程

（c）単離した DNA の塩基配列を決定する工程

（d）工程（c）により決定した DNA の塩基配列を、対照と比較する工程、

〔14〕 以下の（a）～（d）の工程を含む、〔12〕に記載の検査方法、

（a）被検者から DNA 試料を調製する工程

（b）調製した DNA 試料を制限酵素により切断する工程

（c）DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

（d）検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

〔15〕 以下の（a）～（e）の工程を含む、〔12〕に記載の検査方法、

（a）被検者から DNA 試料を調製する工程

（b）〔6〕に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

（c）増幅した DNA を制限酵素により切断する工程

（d）DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

（e）検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

〔16〕 以下の（a）～（e）の工程を含む、〔12〕に記載の検査方法、

（a）被検者から DNA 試料を調製する工程

（b）〔6〕に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

（c）増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程

（d）解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程

（e）分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

〔17〕 以下の（a）～（d）の工程を含む、〔12〕に記載の検査方法、

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 〔6〕に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程

(d) 分離した DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

〔18〕 〔6〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子の発現量を検出することを含む方法、

〔19〕 以下の (a) ～ (c) の工程を含む、〔18〕に記載の検査方法、

(a) 被検者から RNA 試料を調製する工程

(b) 該 RNA 試料に含まれる〔6〕に記載のポリペプチドをコードする RNA の量を測定する工程

(c) 測定された RNA の量を対照と比較する工程

〔20〕 以下の (a) ～ (d) の工程を含む、〔18〕に記載の検査方法、

(a) 被検者から調製した cDNA 試料、および〔5〕に記載のポリペプチドをコードする DNA とハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程

(b) 該 cDNA 試料と該基板を接触させる工程

(c) 該 cDNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該 cDNA 試料に含まれる〔5〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する工程

(d) 測定された〔6〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する工程

〔21〕 以下の (a) ～ (c) の工程を含む、〔18〕に記載の検査方法、

(a) 被検者からタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる〔6〕に記載のポリペプチドの量を測定する

## 工程

(c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程

〔22〕 疾患がIgA腎症またはTn症候群である、〔12〕～〔21〕のいずれかに記載の検査方法、

〔23〕 〔6〕に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド、

〔24〕 〔23〕に記載のオリゴヌクレオチドを含む、〔6〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または〔6〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬、

〔25〕 〔8〕に記載の抗体を含む、〔6〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または〔6〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬、

〔26〕 疾患がIgA腎症またはTn症候群である、〔24〕または〔25〕に記載の検査薬、

〔27〕 ClGal-T2 タンパク質の発現が人為的に改変された遺伝子改変非ヒト動物、

〔28〕 ClGal-T2 タンパク質をコードする外来ポリヌクレオチドが導入された遺伝子改変非ヒト動物、

〔29〕 非ヒト動物がマウスである、〔27〕または〔28〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物、

〔30〕 〔27〕～〔29〕のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物から樹立された細胞、

〔31〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、ClGal-T2 タンパク質の活性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(a) 〔27〕～〔29〕のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物に被検化合



物を投与する、または、〔30〕に記載の細胞と被検化合物を接触させる工程

(b) 前記遺伝子改変動物もしくは細胞における ClGal-T2 タンパク質の活性もしくは発現量を測定する工程

(c) 被検化合物を投与していない場合と比較して、ClGal-T2 タンパク質の活性もしくは発現量を変化させる化合物を選択する工程、を提供するものである。

以下に本明細書に規定された用語の定義を示すが、これらは、本明細書中で使用される用語は理解を容易にする目的で記載されたものであり、本発明を限定する目的で用いられるべきではないことは理解されたい。

本明細書において「ガラクトース転移酵素」とは、UDP ガラクトースを供与体として、ガラクトースを糖、スフィンゴシン、セラミド、ジアシルグリセロール、ヒドロキシリシン等のヒドロキシル基に転移させる酵素を指す。本発明のガラクトース転移酵素とは、通常、ガラクトース転移活性を有するタンパク質を指す。この「ガラクトース転移活性を有する」には、そのタンパク質自体がガラクトース転移活性を有する場合はもちろん、該タンパク質自体が該活性を有さない場合であっても、該タンパク質が他のタンパク質と相互作用をし（例えば、複合体を形成し）、その結果、これらのタンパク質（複合体）がガラクトース転移活性を示す場合も含まれる。

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドであって、複数の塩基または塩基対からなる重合体を意味する。ポリヌクレオチドには、一本鎖型および二本鎖型の DNA を含む。ポリヌクレオチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾された塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような特殊な塩基がある。

本明細書において用いられる「ポリペプチド」は、複数のアミノ酸からなる重合体を意味する。従って、オリゴペプチドおよびタンパク質もまた、ポリペプチドの概念に含まれる。ポリペプチドは、天然に存在する状態から修飾されていない

いもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 $\gamma$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移 RNA 媒介付加、ユビキチン化などが含まれる。

本明細書において「単離」とは、本来の環境（たとえば自然に発生するのであればその自然環境）から取り出された物質（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指し、その自然状態から「人の手によって」変えられたものである。「単離」とは、対象化合物に実質的に富む試料中に存在する化合物および／または対象化合物が部分的または実質的に精製されている試料中に存在する化合物を含むことを意味する。ここで「実質的に精製した」という用語は、その天然の環境から切り離されて、天然に関連している他の成分を少なくとも 60%、好ましくは 75%、および最も好ましくは 90% 含まない化合物（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指す。

本明細書において用いられる「変異」とは、アミノ酸配列におけるアミノ酸の変化または塩基配列における塩基の変化（すなわち単一または複数のアミノ酸またはヌクレオチド置換、欠失、付加または挿入）を指す。従って、本明細書において用いられる「変異体」は、一つ以上のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列または一つ以上の塩基が変化している塩基配列を指す。この変異体の塩基配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。変異体はアレリック変異体のように天然に存

在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。変異体は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する保存的变化を有しうる。まれに、変異体は、非保存的置換を有しうる。生物学的または免疫学的活性を阻害することなく、いずれの、およびどれほど多くのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失するかを決定する手引きは、当技術分野において周知のコンピュータプログラム、例えばDNA スター・ソフトウェアを用いて発見することができる。

「欠失」はその中で1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド残基がそれぞれ、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して存在しない、アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれかの変化である。

「挿入」または「付加」は、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド残基1つ以上が付加されたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

「置換」とは、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、アミノ酸またはヌクレオチド1つ以上がそれぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドに入れ替えられたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

本明細書において用いられる「ハイブリダイズ」とは、核酸鎖が塩基対形成を通じて相補鎖と結合するプロセスを意味する。

本明細書で用いられる「治療」とは、概して、薬理的なおよび／または生理学的な効果を得ることを意味する。効果とは、疾患や症状を完全にあるいは部分的に妨げる点で予防的であってもよく、疾患の症状を完全にあるいは部分的に治療する点で治療的であっても良い。本明細書で用いられる「治療」という用語は、哺乳類、特にヒトにおける疾患の治療すべてを含んでいる。そしてさらに、疾患

の素因があるが未だ発病していると診断されていない被検者の発病の予防、疾患の進行を抑制すること、または疾患を軽減させることなどもこの用語に含まれる。

### <ポリペプチド>

本発明は、ガラクトース転移酵素をコードする新規なポリペプチドを提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより同定された新規ガラクトース転移酵素 CiGal-T2 をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：1 に、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。また、本発明者らにより同定された新規ガラクトース転移酵素 CiGal-T3 をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：18 に、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：19 に示す。

本発明は、また、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有していることを意味する。ガラクトース転移酵素が持つ生物学的特性としては、ガラクトースを糖、スフィンゴシン、セラミド、ジアシルグリセロール、ヒドロキシリシン等のヒドロキシル基に転移させる活性（ガラクトース転移酵素活性）が挙げられる。本発明の好ましい態様においては、GalNAc  $\alpha$ 1-ペプチドの GalNAc に  $\beta$ 1,3 結合でガラクトースを転移させる酵素活性（コア1  $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素活性）を例示することができる。

従って、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有しているか否かの判定は、当業者においては周知の方法によってガラクトース転移酵素活性を測定することにより行うことができる。例えば、放射線同位元素で標識した UDP-Gal を糖供与体基質として、生成物に取り込まれる放射線の量を測定することにより行うことができる。より具体的には、後述の実施例に記載された方法により、ガラクトース転移酵素活性を測定するこ

とができる。

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の1つの態様としては、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 8.1-8.5))が含まれる。また、ポリペプチド中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、本発明者らにより同定されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号: 2または19)において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加などにより変異したタンパク質であって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドが含まれる。

置換されるアミノ酸は、タンパク質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

これらポリペプチドにおけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel e

t al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 6.3-6.4)を利用して本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA 配列 (配列番号: 1 または 18) またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることは、通常行いうることである。このように本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされるポリペプチドであって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドもまた本発明のポリペプチドに含まれる。

このようなポリペプチドを単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウザギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードする DNA を単離するためのストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素 (例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など) を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA がコードするポリペプチドは、通常、本発明者らにより同定されたポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも 40% 以上、好

ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは少なくとも95%以上、さらに好ましくは少なくとも97%以上（例えば、98~99%）の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA 配列 (配列番号: 1 または 18) の一部を基にプライマーを設計し、本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA 配列と相同性の高い DNA 断片を単離し、該 DNA を基に本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることも可能である。

本発明のポリペプチドは「成熟」タンパク質の形であっても、融合タンパク質のような、より大きいタンパク質の一部であってもよい。本発明のポリペプチドには、分泌すなわちリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、または組換え生産の際の安定性を確保する付加的配列などが含まれていてもよい。

#### <ポリペプチドの断片>

本発明は、また、本発明のポリペプチドの断片を提供する。こうした断片は全

体的に前記本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。本発明のポリペプチド断片は、通常、8 アミノ酸残基以上、好ましくは 12 アミノ酸残基以上（例えば、15 アミノ酸残基以上）の配列からなるポリペプチド断片である。好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含む一連の残基とカルボキシル末端を含む一連の残基の二連の残基の欠失したアミノ酸配列を有するトランケーション(truncation)ポリペプチドが含まれる。また、 $\alpha$  ヘリックスと  $\alpha$  ヘリックス形成領域、 $\beta$  シートと  $\beta$  シート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、 $\alpha$  両親媒性領域、 $\beta$  両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。その他の好適な断片は生物学的に活性な断片である。生物学的に活性な断片は、同様の活性をもつ断片、その活性が向上した断片、または望ましくない活性が減少した断片を含めて、本発明のポリペプチドの活性を媒介するものである。さらに、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性がある断片も含まれる。これらのポリペプチド断片は、抗原活性を含めた本発明のポリペプチドの生物学的活性を保持することが好ましい。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は同類アミノ酸置換により対象物と異なるもの、すなわち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型的なこうした置換は、Ala, Val, Leu と Ile の間、Ser と Thr の間、酸性残基 Asp と Glu の間、Asn と Gln の間、塩基性残基 Lys と Arg の間、または芳香族残基 Phe と Tyr の間で起こる。

#### <ポリペプチドの製造>

本発明のポリペプチドは任意の適当な方法で製造することができる。このよう



なポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に製造されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせにより製造されたポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドの製造のための手段は当業界でよく理解されている。組み換え的なポリペプチドは、例えば、本発明のポリヌクレオチドを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したポリペプチドを精製することにより調製することが可能である。一方、天然由来のポリペプチドは、例えば、後述する本発明のポリペプチドに対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション (例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M. C., Jackson, R. J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照) などにより本発明のポリペプチドを調製することも可能である。本発明のポリペプチドの断片は、例えば、本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

#### <ポリヌクレオチド>

本発明は、また、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1または18に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、遺伝コードの縮重により配列番号：1または18に記載の塩基配列と異なる塩基配列からなるが配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。本発明のポリヌクレオチドには、さらに、これ

らポリヌクレオチドがコードするポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードし、該ポリヌクレオチドの配列とその全長において少なくとも 40% 以上、好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上（例えば、98~99%）同一である塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。塩基配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN と呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。本発明のポリヌクレオチドには、上記のポリヌクレオチドの塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニングにより、例えば、細胞中の mRNA から誘導された cDNA ライブラリーから得ることができる。また、本発明のポリヌクレオチドはゲノム DNA ライブラリーのような天然源から得ることができ、商業的に入手可能な公知の技法を用いて合成することもできる。

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1または18）と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4) や遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を利用して調製す

ることができる。即ち、ハイブリダイゼーション技術を利用して、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1または18）またはその一部をもとに同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同性の高いDNAを単離することができる。また、遺伝子増幅技術を用いて、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1または18）の一部を基にプライマーを設計し、該ポリヌクレオチドの配列と相同性の高いポリヌクレオチドを単離することができる。従って、本発明には、配列番号：1または18に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが含まれる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号：1または18に記載の塩基配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5)）を利用して調製することもできる。また、このようなポリヌクレオチドは、自然界における変異により生じることもある。本発明には、このような塩基配列の変異により、配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加

などされたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え生産のために用いる場合、そのポリヌクレオチドには、成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片単独、他のコード配列（例えば、リーダーもしくは分泌配列、プレ-、プロ-もしくはプレプロ-タンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコードするもの）と同じリーディングフレーム内にある成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片が含まれる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされ得る。本発明のこの態様の好ましい具体例として、マーカー配列は、pcDNA3.1/Myc-His ベクター（Invitrogen 社）により提供されかつ Gentz ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824 に記載されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチド、または Myc タグである。また、このポリヌクレオチドは 5' および 3' 非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、および mRNA 安定化配列を含んでいてもよい。

#### <プローブ・プライマー・アンチセンス・リボザイム>

本発明は、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：1 もしくは 18 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖）に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただし RNA の場合は U）、G:C の塩基対からなる 2 本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、ま

た、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15~100 ヌクレオチド、好ましくは15~35 ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明の DNA の少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30 ヌクレオチドの鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明のポリペプチドをコードする DNA に特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジントな条件下で、本発明者らにより同定されたヌクレオチド（配列番号：1または18）とハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードする DNA とはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの活性の異常や該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常を検査・診断するために利用できる。

また、これらヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドには、アンチセンスポリヌクレオチド（アンチセンス DNA/RNA； 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンス RNA、および該 RNA をコードする DNA）やリボザイム（本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA）が含まれる。

アンチセンスポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプラ

イシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座 2 核酸 IV 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 319-347, 1993)。

本発明で用いられるアンチセンスポリヌクレオチドは、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドも、本発明で利用されるアンチセンスポリヌクレオチドに含まれる。使用されるアンチセンスポリヌクレオチドは、( 適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは 3' 側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。アンチセンスポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写された RNA は、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15 ヌクレオチド以上、好ましくは 100 ヌクレオチド、さらに好ましくは 500 ヌクレオチド以上の鎖長を有し、通常、3000 ヌクレオチド以内、好ま

しくは 2000 ヌクレオチド以内の鎖長を有する。

このようなアンチセンスポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドの異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。

シアリルルイスX糖鎖およびシアリル6スルホルイスX糖鎖は、接着分子セレクチン分子のリガンドであり、リンパ球のホーミング現象、炎症局所での白血球の血管外遊走のための血管内皮細胞への接着、癌細胞の血行性転移に関与していると言われている。これらの糖鎖抗原は、糖タンパク質および糖脂質両方に存在しており、糖タンパク質上でもN-結合型、O-結合型の両方に存在する。O-結合型糖鎖の場合、主にCore 1構造から糖鎖の伸長、分岐が生じて、非還元末端側にシアリルルイスXおよびシアリル6スルホルイスX糖鎖が存在する。よって、Core 1構造の合成の阻害することにより、これらの糖鎖抗原の発現を抑制できる可能性がある。すなわちCore 1合成酵素(C1Gal-T)の活性または発現を抑制することにより、抗癌作用もしくは抗炎症作用が期待される。例えば、本発明のC1Gal-T2またはC1Gal-T3に対するアンチセンスポリヌクレオチドは、酵素活性阻害剤として、抗炎症作用および血行性転移の抑制に使用できる可能性がある。該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1または18）の配列情報を基にホスホロチオネート法(Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988))などにより調製することが可能である。

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするポリヌクレオチドを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるMIRNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのも

のもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる 40 ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15 の C15 の 3' 側を切断するが、活性には U14 が 9 位の A と塩基対を形成することが重要とされ、15 位の塩基は C の他に A または U でも切断されることが示されている(M.Koizumi ら, (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍の RNA 配列と相補的になるように設計すれば、標的 RNA 中の UC、UU または UA という配列を認識する制限酵素的な RNA 切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumi ら, (1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191、M.Koizumi ら, (1989) Nucleic Acids Res. 17:7059)。

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライト RNA のマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的特異的な RNA 切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi および N.Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo 法や in vivo 法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

また、最近の研究により、炎症に伴って血小板表面に出現する接着分子の P-セレクチンと結合する、新規の糖オリゴペプチド GSP-6 が見出された(Leppanen A. et al., J. Biol. Chem. 274: 24838-24848, 1999)。GSP-6 は、リンパ球の



P-セレクトインへの接触を阻害する。従って GSP-6 は、セレクトインが関与する炎症反応、または癌細胞の血行性転移等を抑制する機能を有するものと考えられる。GSP-6 は、抗炎症剤および抗癌剤等の開発にとって有用な分子と言える。この GSP-6 の合成には、コア 1 糖鎖の合成酵素が必要であることから、本発明のポリペプチドは、細胞接着を阻害する糖オリゴペプチド GSP-6 の合成に利用できるものと考えられ、大いに有用である。

内因性遺伝子の発現の阻害は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖 RNA を用いた RNA 干渉 (RNA interference ; RNAi) によっても行うことができる。RNAi とは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖 RNA を細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも阻害される現象のことを指す。RNAi の機構の詳細は明らかではないが、最初に導入した二本鎖 RNA が小片に分解され、何らかの形で標的遺伝子の指標となることにより、標的遺伝子が分解されと考えられている。RNAi に用いる RNA は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子もしくは該遺伝子の部分領域と必ずしも完全に同一である必要はないが、完全な相同性を有することが好ましい。また、二重鎖 RNA を細胞内で合成し得る DNA 分子を導入することもできる。

#### <ベクター、宿主細胞、ポリペプチドの製造>

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター、本発明のポリヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの生産方法を提供する。

本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター (Stratagene 社製) などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクタ

一が有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター（プロメガ社製）、大腸菌であれば pET ベクター（Invitrogen 社製）、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であれば pME18S ベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11）。

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、真菌細胞（例：酵母、アスペルギルス）、昆虫細胞（例：ドロソフィラ S2、スポドプテラ SF9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞）および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクタミン法（GIBCO-BRL 社製）、マイクロインジェクション法などの公知の方法を行うことが可能である。

宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、そ

の細胞をまず溶解し、その後にポリペプチドを回収する。

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

#### <検査方法>

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法を提供する。ガラクトース転移酵素は、生体内で重要な機能を有すると考えられ、その発現や機能の異常は、種々の疾患の原因となり得る。従って、本発明のポリペプチドの不適當な活性または発現を指標とすることにより、このような疾患の検査を行うことも可能である。

本発明において「疾患の検査」とは、疾患の症状を呈している被検者の治療戦略を立てるための検査のみならず、被検者が疾患にかかりやすいか否かを判断するために行う予防のための検査、または既に罹患しているか否かの検査も含まれる。

最近の研究から、IgA 腎症や Tn 症候群などの疾病において、ガラクトース転移酵素活性が低下あるいは欠損しているとの報告が多数なされている。従って、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常によって、例えば、IgA 腎症、Tn 症候群等の疾患が引き起こされることも十分考えられる。本発明において、「本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患」とは、例えば、IgA 腎症、Tn 症候群等を例示することができる。

本発明の検査方法の一つの態様は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域における変異を検出することを含む方法である。

一つの方法は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域の塩基配列を直接決定することによって検査を行う方法である。この方法においては、まず、被検者から DNA 試料を調製する。DNA 試料は、被検者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から抽出した染色体 DNA あるいは RNA を基に調製することができる。染色体 DNA から本方法の DNA 試料を調製するには、例えば染色体 DNA を適当な制限酵素で切断し、ベクターにクローニングして、ゲノムライブラリーを作製すればよい。RNA から本方法の DNA 試料を調製するには、例えば、逆転写酵素を用いて、RNA から cDNA ライブラリーを作製すればよい。本方法においては、次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を単離する。該 DNA の単離は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA にハイブリダイズするプローブを用いて、ゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーのスクリーニングをすることにより行うことができる。また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA にハイブリダイズするプライマーを用いて、ゲノム DNA ライブラリー、cDNA ライブラリー、あるいは RNA を鋳型とした PCR によって単離することもできる。本方法においては、次いで、単離した DNA の塩基配列を決定する。選択した DNA の塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。本方法においては、次いで、決定した DNA の塩基配列を、対照と比較する。本方法における「対照」とは、正常な（野生型の）本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA の塩基配列を言う。このような比較の結果、被検者の DNA の塩基配列が対照と異なっていた場合には、被検者は、疾患に罹患しているまたは発症の危険があると判定される。

本発明の検査方法は、上記の如く直接被検者由来の DNA の塩基配列を決定する方法以外に、種々の方法を用いることができる。

その一つの方法においては、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、調製した DNA 試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA 断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を制限酵素により切断する。次いで、DNA 断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する。

このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP) を利用した方法や PCR-RFLP 法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じる DNA 断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分を PCR 法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体 DNA をこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプロブ DNA を用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノム DNA 以外にも被検者から調製した RNA を逆転写酵素で cDNA にし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロッティングを行うことも可能である。また、この cDNA を鋳型として PCR で本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

別の方法は、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、本発明のポリペ

プチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる。次いで、解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する。

このような方法としては、例えば PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型) 法 (Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.) が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数の DNA 試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖 DNA 断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離した DNA 鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖 DNA が異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖 DNA の高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することにより DNA 断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入等による変異が存在することを検出することができる。

具体的には、まず、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を PCR 法等によって増幅する。増幅される範囲としては、通常 200~400bp 程度の長さが好ましい。PCR は、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCR の際に、 $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、増幅 DNA 産物を標識することができる。あるいは PCR 反応液に  $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光

色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えて PCR を行うことにより、増幅 DNA 産物を標識することも可能である。さらに、PCR 反応後にクレノウ酵素等を用いて、 $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅 DNA 断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識された DNA 断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5 から 10% 程度）のグリセロールを添加することにより、DNA 断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各 DNA 断片の性質により変動するが、通常、室温（20 から 25℃）で行い、好ましい分離が得られないときには 4 から 30℃ までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA 断片の移動度を、X 線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCR によって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識した DNA を使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

さらに別の方法は、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する。次いで、分離した DNA のゲル上での移動度を対照と比較する。

このような方法としては、例えば、変性剤濃度勾配ゲル（denaturant gradient gel electrophoresis：DGGE 法）等を例示することができる。DGGE 法は、変性剤の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル中で、DNA 断片の混合物を泳動し、それぞれの不安定性の違いによって DNA 断片を分離する方法である。ミスマッチのある不安定な DNA 断片が、ゲル中のある変性剤濃度の部分まで移動すると、ミ

スマッチ周辺の DNA 配列はその不安定さのために、部分的に 1 本鎖へと解離する。この部分的に解離した DNA 断片の移動度は、非常に遅くなり、解離部分のない完全な二本鎖 DNA の移動度と差がつくことから、両者を分離することができる。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を本発明のプライマー等を用いた PCR 法等によって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、対照と比較する。変異が存在する DNA 断片の場合、より低い変性剤濃度位置で DNA 断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料 DNA でハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。また、リボヌクレアーゼ A ミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を含む DNA を PCR 法等によって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだ対照 cDNA 等から調製した標識 RNA とハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼ A によって切断し、これをオートラジオグラフィー等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

本発明の検査方法の他の態様は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を検出することを含む方法である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳が含まれる。従って、「発現産物」には、mRNA およびタンパク質が含



まれる。

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写レベルにおける検査法においては、まず、被検者から RNA 試料を調製する。次いで、該 RNA 試料に含まれる本発明のポリペプチドをコードする RNA の量を測定する。次いで、測定された本発明のポリペプチドをコード RNA の量を対照と比較する。

このような方法としては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたノーザンブロットィング法、または本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーを用いた RT-PCR 法等を例示することができる。

また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写レベルにおける検査においては、DNA アレイ（新遺伝子工学ハンドブック、村松正實・山本雅、羊土社、p280-284）を利用することもできる。具体的には、まず、被検者から調製した cDNA 試料、および本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する。基板に固定されるポリヌクレオチドプローブは、複数種の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するために、複数種であってもよい。被検者からの cDNA 試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。cDNA 試料の調製の好ましい態様においては、まず被検者の細胞から全 RNA の抽出を行う。細胞としては、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料の細胞などが例示できる。全 RNA の抽出は、例えば次のようにして行うことができる。純度の高い全 RNA が調製できる方法であれば、既存の方法およびキット等を用いることが可能である。例えば Ambion 社 "RNA later" を用い前処理を行った後、ニッポンジーン社 "Isogen" を用いて全 RNA の抽出を行う。具体的方法にはそれらの添付プロトコールに従えばよい。次いで、抽出した全 RNA を鋳型として、逆転写酵素を用いて cDNA の合成を行い、cDNA 試料を調製する。全 RNA からの cDNA の合成は、当業者に周知の方法で実施することができる。調製した cDNA 試料には、必要に応

じて、検出のための標識を施す。標識物質としては、検出可能なものであれば特に制限はなく、例えば、蛍光物質、放射性元素等を挙げることができる。標識は、当業者によって一般的に行われる方法(L Luo et al., Gene expression profile of laser-captured adjacent neuronal subtypes. Nat Med. 1999, 117-122)で実施することができる。

本発明において「基板」とは、ポリヌクレオチドを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明の基板は、ポリヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般に DNA アレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。

DNA アレイ技術の利点は、ハイブリダイゼーションの溶液量が非常に少なく、固定されたヌクレオチドプローブに、細胞の全 RNA に由来する cDNA を含む非常に複雑なターゲットをハイブリダイズすることができることである。一般に DNA アレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらの DNA は非透過性(non-porous)の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用しすることができる。ヌクレオチドの固定(アレイ)には2つのタイプがあり、一つは Affymetrix 社開発によるポリヌクレオチドを基本としたアレイであり、もう一つは主として Stanford 大学で開発された cDNA のアレイである。ポリヌクレオチドのアレイにおいて、ポリヌクレオチドは通常インサイチュ(in situ)で合成される。例えば、photolithographic の技術(Affymetrix 社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット(Rosetta Inpharmatics 社)技術等によるポリヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。基板に固定するポリヌクレオチドプローブは、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリダイズするものであれば特に制限はない。本発明のポリヌクレオチドプローブには、ポリヌクレオチド、または cDNA が含まれる。

ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと実質的にハイブリダイズし、それ以外のポリヌクレオチドとは実質的にハイブリダイズしないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ポリヌクレオチドプローブは、検出の対象となるポリヌクレオチドの塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。基板に結合するポリヌクレオチドプローブの長さは、通常 cDNA を固定する場合 100～4000 ベースであり、好ましくは 200～4000 ベースであり、さらに好ましくは 500～4000 ベースである。合成ポリヌクレオチドを固定する場合は、通常 15～500 ベースであり、好ましくは 30～200 ベースであり、さらに好ましくは 50～200 ベースである。基板へのポリヌクレオチドの固定の工程は、一般に「プリント」とも呼ばれる。具体的には、例えば以下のようにプリントすることができるが、これに限定されるものではない。数種のポリヌクレオチドプローブを 4.5 mm x 4.5 mm の一つの領域内にプリントする。その際、それぞれのアレイをプリントするには一つのピンを用いて行うことが可能である。従って 48 ピンのツールを用いた場合、48 回の繰り返したアレイを一つの標準的な顕微鏡用スライドにプリントすることが可能である。

本方法においては、次いで、該 cDNA 試料と該基板を接触させる。本工程により、本発明のポリペプチドをコードする DNA と特異的にハイブリダイズ可能な基板上のヌクレオチドプローブに対し、cDNA 試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

本方法においては、次いで、該 cDNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該 cDNA 試料に含まれる本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する。さらに、測定された本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する。

本発明においては、cDNA 試料中に本発明のポリペプチドをコードする遺伝子

由来の cDNA が存在する場合、基板に固定されたヌクレオチドプローブと該 cDNA とがハイブリダイズする。従って、ポリヌクレオチドプローブと該 cDNA とのハイブリダイズの強度を検出することにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定することができる。ポリヌクレオチドプローブと該 cDNA とのハイブリダイズの強度の検出は、cDNA 試料を標識した物質の種類に応じて当業者においては適宜行うことができる。例えば、cDNA が蛍光物質によって標識された場合、スキャナーによって蛍光シグナルを読み取ることによって検出することができる。

本発明の方法においては、被検者および対照（健常者）由来の cDNA 試料について、異なる蛍光物質で標識を施すことにより、1 回の測定でそれぞれにおける本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を同時に測定することができる。例えば、上記それぞれの cDNA 試料の一方を蛍光物質である Cy5 で、他方を Cy3 で標識することができる。それぞれの蛍光シグナルの相対強度は、被検者および対照での本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量に応じた相対量を示す (Duggan et al., Nat. Genet. 21: 10-14, 1999)。

一方、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の翻訳レベルにおける検査においては、まず、被検者からポリペプチド試料を調製する。次いで、該ポリペプチド試料に含まれる本発明のポリペプチドの量を測定する。次いで、測定された本発明のポリペプチドの量を対照と比較する。

このような方法としては、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法、並びに本発明のポリペプチドに結合する抗体を用いた、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法 (ELISA)、および免疫蛍光法を例示することができる。

上記の方法において、対照と比較して、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量が有意に変化していた場合、被検者は、該遺伝子の発現異常に関連した疾患を罹患している、または該疾患を発症する危険を有すると判定される。

### ＜検査薬＞

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬を提供する。

その一つの態様は、上記した本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその発現制御領域を含む DNA にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む検査薬である。該オリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査方法において、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を検出するためのプローブとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を増幅するためのプライマーとして用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得されるの二本鎖 DNA 断片として作製することもできる。本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの 5' 端を  $^{32}\text{P}$  でリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等の DNA ポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして  $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

本発明の検査薬の他の一つの態様は、後述する本発明のポリペプチドに結合する抗体を含む検査薬である。該抗体は、上記の本発明の検査方法において、本発明のポリペプチドを検出するために用いられる。抗体は、本発明のポリペプチドを検出可能であればその形態に制限はない。検査のための抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。抗体は必要に応じて標識されていてもよい。

上記の検査薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSA やゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

#### <抗体>

本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらに Fab または他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含む Fab フラグメントが含まれる。

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはその GST との融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明

のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドやこれを発現する細胞の単離、同定、および精製に利用することができる。本発明のポリペプチドに結合する抗体は、本発明のポリペプチドの活性または発現を抑制するものと考えられることから、該抗体を有効量含む組成物は、本発明のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物となるものと期待される。また、該抗体は、本発明のポリペプチドの発現異常に関連した疾患の検査において、本発明のポリペプチドの発現量を測定するために用いることもできる。

#### ＜治療薬候補化合物の同定＞

本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの発現異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニングにおいて使用することができる。同定の対象となるこれら分子は、天然由来であっても、人工的に合成された構造的または機能的な模擬物であってもよい。本発明のポリペプチドは多くの病理を含めて多数の生物学的機能に関与している。従って、本発明のポリペプチドを活性化する化合物および本発明のポリペプチドの活性化を阻害し得る化合物を発見することが望まれる。

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニング方法を提供する。本方法においては、まず、本発明のポリペプチドと候補化合物とを接触させ、次いで、本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性

を測定する。そして、被験化合物を接触させない場合と比較して、ガラクトース転移酵素活性を変化させる（増加または抑制させる）化合物を選択する。

本発明の上記スクリーニング方法により本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を増加させる化合物として単離される化合物は、例えば、IgA腎症、またはTn症候群等の疾患に対する治療薬として有用である。一方、本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を抑制させる化合物として単離される化合物は、酵素活性阻害剤として、例えば、抗炎症剤、または抗癌剤として有用である。さらに、本発明のポリペプチドを結晶化することによりドラッグデザインされた化合物は、酵素活性阻害剤として使用することも可能である。また、該化合物は被験化合物として、本発明の上記スクリーニング方法に供することもできる。

ガラクトース転移酵素活性の測定は、例えば、上述の方法により行うことができる。被検化合物としては、特に制限はなく、例えば、種々の公知化合物やペプチド（例えば、ケミカルファイルに登録されているもの）あるいはファージ・ディスプレイ法（J. Mol. Biol. (1991) 222, 301-310）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

#### <疾患の治療のための医薬組成物>

本発明は、本発明のポリペプチドの活性または発現を増加または抑制させる必要がある患者を治療するための医薬組成物を提供する。

本発明のポリペプチドの活性または発現を増加させるための、医薬組成物の有効成分としては、本発明のポリヌクレオチド、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクター、本発明のポリペプチドを用いることができる。一方、本発明の



ポリペプチドの活性または発現を抑制させるための医薬組成物の有効成分としては、本発明のポリペプチドに対する抗体、または生体内において内因性の本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドを用いることができる。該ポリヌクレオチドとしては、上記したアンチセンスポリヌクレオチドやリボザイムが含まれる。

治療用化合物を医薬品として用いる場合には、該化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。

患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

遺伝子治療用ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを例示することができる。該ベクターを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ目的のDNAの投与を行うことができる。

#### <遺伝子改変動物>

本発明は、本発明の ClGal-T2 タンパク質の発現が人為的に改変された遺伝子改変非ヒト動物を提供する。

上記 C1Gal-T2 タンパク質は、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに必ずしも限定されず、遺伝子を改変される動物が内在的に有する該ポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、あるいは該動物についてのホモログタンパク質等も含まれる。

本発明において、「C1Gal-T2 遺伝子の発現が人為的に改変された」とは、通常、C1Gal-T2 タンパク質をコードする遺伝子上に、ヌクレオチドの付加、挿入、欠失、置換等の遺伝子変異を有することにより該遺伝子の発現量が変化した状態、該 C1Gal-T2 遺伝子のコピー数が変化した状態、あるいは、C1Gal-T2 をコードする外来性の DNA が導入された状態等を指す。例えば、C1Gal-T2 遺伝子ノックアウト非ヒト動物、あるいは、C1Gal-T2 遺伝子トランスジェニック非ヒト動物は、本発明の遺伝子改変非ヒト動物に含まれる。遺伝子変異が存在する部位は、該遺伝子の発現が改変され得る部位であれば特に制限されず、例えばエキソン部位、プロモーター部位等を挙げることができる。

また、正常な C1Gal-T2 タンパク質としての機能が亢進あるいは低下している変異 C1Gal-T2 タンパク質が発現している場合も、この C1Gal-T2 遺伝子の発現の「改変」に含まれる。通常、遺伝子の発現制御領域、例えばプロモーター部位に変異を有すると、遺伝子の発現が亢進する場合があることが知られている。従って、本発明の「改変」の一つの態様としては、C1Gal-T2 遺伝子の発現制御領域が、C1Gal-T2 遺伝子の発現が亢進するように変異が導入された状態を示すことができる。

また、本発明は、内因性の C1Gal-T2 遺伝子の発現が亢進した非ヒト動物以外に、例えば、発現可能な状態の C1Gal-T2 タンパク質をコードする外来 DNA が導入された非ヒト動物を好適に示すことができる。即ち、本発明の好ましい態様においては、C1Gal-T2 タンパク質をコードする外来 DNA が導入された遺伝子改変非ヒト動物を提供する。

本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、例えば、IgA 腎症、または Tn 症候群等

の疾患のための治療薬のスクリーニング方法に利用することが可能であり、非常に有用である。

本方法における「非ヒト動物」とは、ヒトを含まない脊椎動物や無脊椎動物を意味する。遺伝子改変技術を用いて遺伝子の発現を人為的に改変するのに適した非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物や昆虫等が挙げられるが、より好適には、非ヒト哺乳動物（例えば、マウスやラットなどのげっ歯類）であり、最も好ましくはマウスである。

遺伝子改変動物の作製方法は公知である。例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 77:7380-7384(1980)に記載の方法により、遺伝子改変動物を得ることができる。

例えば、ClGal-T2 ダンパク質をコードする外来 DNA が導入された遺伝子改変非ヒト動物（トランスジェニック動物）を作製する場合には、まず、ClGal-T2 をコードする DNA を動物の全能細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させる。得られた個体のうち、体細胞および生殖細胞中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって、目的とする遺伝子改変動物を作製することができる。遺伝子を導入する全能細胞としては、受精卵や初期胚のほか、多分化能を有する ES 細胞のような培養細胞などが挙げられる。当業者においては、公知の方法を適宜改変して、所望の遺伝子の発現が改変された遺伝子改変動物を作製することが可能である。

上記の「ClGal-T2 をコードする DNA」は、該 DNA を導入すべき動物の細胞において発現可能なプロモーターに連結した組み換え遺伝子コンストラクト（発現ベクター）とするのが一般的である。本発明の組み換え遺伝子コンストラクトは、適当な宿主を利用してクローニング可能なベクターに、前記 ClGal-T2 をコードする DNA と、その上流にプロモーターとを挿入し、クローニングすることによって構築することができる。

本発明に利用することができるプロモーターとしては、動物細胞で発現可能な

プロモーターであれば特に制限されず、例えば、哺乳動物細胞由来のプロモーターや、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV40) 等のウィルスプロモーターを挙げる事ができる。例えば、SV40 のプロモーターを使用する場合は、Mulligan らの方法 (Nature (1990) 277, 108) に従って、上記コンストラクトを作製することができる。

また、本発明に使用可能なベクターとしては、好ましくは、CAG ベクター (例えば、pCAGGS) を挙げる事ができる。このベクター以外にも、導入遺伝子を動物の生体内で広範囲に発現誘導でき得るものであればよく、当業者において周知の発現ベクターを利用することができる。具体的には、pCAGGS 以外では、human polypeptide chain elongation factor 1 alpha (hEF1 $\alpha$ ) のプロモーター (Hanaoka K et al.: Differentiation 1991; 48: 183-189) や CMV のプロモーター-エンハンサーを有するベクター (Schmidt E. V. et al.: Mol. Cell. Biol. 1990: 10: 4406-4411) 等を好適に用いることができる。

また、CMV に由来するエンハンサーは、哺乳動物における外来遺伝子の発現を増強することが知られている。従って本発明の上記コンストラクトには、外来遺伝子の発現を増強するために、エンハンサーを組み合わせることができる。

これらの遺伝子から構成される組み換え遺伝子コンストラクトの構築にあたり、エンハンサーとプロモーターを備え、さらにその下流に外来遺伝子挿入用のマルチクローニングサイトを配置したベクターを用いることができる。このような構造を持つベクターは、たとえば pCAGGS 等をもとに構築することができる。

適当な制限酵素によって前記ベクターから切り出した組み換え遺伝子コンストラクトは、十分に精製され遺伝子改変動物の作製に用いられる。通常、遺伝子改変動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに、前記コンストラクトを導入することによって作製される。コンストラクトを導入する細胞としては、通常、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階、より具

体的には単細胞あるいは受精卵細胞の段階で、通常 8 細胞期以前のものが利用される。上記コンストラクトの導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等が公知である。さらに、こうして得られた形質転換細胞を上述の胚芽細胞と融合させることにより遺伝子改変動物を作製することも可能である。

上記コンストラクトを導入する細胞は、遺伝子改変動物の作製が可能なあらゆる非ヒト動物に由来する細胞であることができる。具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、イヌ、あるいはネコ等の細胞を利用することができる。マウスの場合、例えば、排卵誘発剤を投与したメスのマウスに正常なオスのマウスを交配させることにより、コンストラクトの導入が可能な受精卵を回収することができる。マウス受精卵では、一般に雄性前核へのマイクロインジェクションによりコンストラクトが導入される。コンストラクトを導入した細胞は、体外での培養の後、導入に成功したと思われる細胞が代理母の卵管に移植され、遺伝子改変キメラ動物が誕生する。代理母には、通常、精管を切断したオスと交配させて偽妊娠状態としたメスが利用される。

生まれた遺伝子改変キメラ動物は、C1Gal-T2 をコードする DNA が組み込まれていることを確認した上で、F1 動物の誕生のために正常な動物と交配させる。一般にコンストラクトとして導入した外来 DNA は、ゲノムの同一の部分に複数コピーが直列に組み込まれる。通常はこの組み込みコピー数が多いほど、多量の遺伝子発現につながり、より明瞭な表現型が期待できるためである。体細胞ゲノムにおいて、C1Gal-T2 をコードする DNA が正しい方向で組み込まれていることは、コンストラクトに特異的なプライマーを用いた PCR や特異的なプローブを用いたサザンブロット法によって確認することができる。

この交配の結果誕生する F1 動物の中で、体細胞に外来遺伝子 (C1Gal-T2 をコードする DNA) を有するもの (ヘテロザイゴート) は、生殖細胞に外来遺伝子

(C1Gal-T2 をコードする DNA) を伝えることができる遺伝子改変動物である。F1 動物の中から体細胞に外来遺伝子 (C1Gal-T2 をコードする DNA) を保持するものを選び、これらを両親とすることによって、F2 動物であるホモザイゴートを得ることができる。

本発明の C1Gal-T2 遺伝子改変動物は、C1Gal-T2 の発現が改変されたものであれば、上記の遺伝子改変動物のいずれの世代の動物であってもよい。例えば、C1Gal-T2 の外来 DNA をヘテロで保持する遺伝子改変動物であってもよい。

また、C1Gal-T2 遺伝子の発現を人為的に抑制する手段としては、C1Gal-T2 遺伝子全体またはその一部を欠損させる方法や C1Gal-T2 遺伝子の発現制御領域の全部またはその一部を欠損させる方法等を例示することができるが、好ましくは C1Gal-T2 遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子を挿入することにより C1Gal-T2 遺伝子を不活性化する方法である。

本発明の C1Gal-T2 遺伝子の発現が人為的に抑制された動物、例えば、C1Gal-T2 遺伝子ノックアウト動物は、当業者においては一般的に公知の遺伝子工学技術により作製することができる。例えば、非ヒト動物としてマウスを例にとって説明すると、以下のようにして本発明のノックアウトマウスを作製することができる。まず、マウスから C1Gal-T2 遺伝子のエクソン部分を含む DNA を単離し、この DNA 断片に適当なマーカー遺伝子を挿入し、ターゲッティングベクターを構築する。このターゲッティングベクターをエレクトロポレーション法などによりマウスの ES 細胞株に導入し、相同組み換えを生じた細胞株を選抜する。挿入するマーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子が好ましい。抗生物質耐性遺伝子を挿入した場合には、抗生物質を含む培地で培養するだけで相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。また、より効率的な選抜を行うためには、ターゲッティングベクターにチミジンキナーゼ遺伝子などを結合させておくことも可能である。これにより、非相同組み換えを起こした細胞株を排除することができる。また、PCR およびサザンブロットにより相同組み

換え体の検定を行い、C1Gal-T2 遺伝子の遺伝子対の一方が不活性化された細胞株を効率よく得ることもできる。

相同組み換えを生じた細胞株を選抜する場合、相同組み換え箇所以外にも、遺伝子挿入による未知の遺伝子破壊の恐れがあることから、複数のクローンを用いてキメラ作製を行うことが好ましい。得られた ES 細胞株をマウス胚盤葉にインジェクションしキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、C1Gal-T2 遺伝子の遺伝子対の一方を不活性化したマウスを得ることができる。さらに、このマウスを交配させることで、C1Gal-T2 遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したマウスを取得することができる。マウス以外の ES 細胞が樹立された動物においても、同様の手法により、遺伝子ノックアウトを行うことができる。

また、C1Gal-T2 遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化した ES 細胞株は、以下の方法により取得することも可能である。すなわち、遺伝子対の一方を不活性化した ES 細胞株を高濃度の抗生物質を含む培地で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化された細胞株、即ち、C1Gal-T2 遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化した ES 細胞株を得ることができる。また、遺伝子対の一方を不活性化した ES 細胞株を選抜し、この細胞株に再度ターゲッティングベクターを導入し、相同組換えを生じた細胞株を選択することでも作製することができる。ターゲッティングベクターに挿入するマーカー遺伝子は、前出のマーカー遺伝子とは異なるものを使用することが好ましい。

さらに本発明の C1Gal-T2 遺伝子の発現が人為的に抑制された動物は、例えば、以下の (a) ~ (c) に挙げるポリヌクレオチドを該動物へ導入することによっても、作製することが可能である。

(a) C1Gal-T2 タンパク質をコードする遺伝子の転写産物、またはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド

(b) C1Gal-T2 タンパク質をコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂する

リボザイム活性を有するポリヌクレオチド

(c) C1Gal-T2 タンパク質をコードする遺伝子の発現を、RNAi 効果により阻害するポリヌクレオチド。

また、本発明は、本発明の遺伝子改変動物から樹立された細胞を提供する。本発明の遺伝子改変動物由来の細胞株を樹立する方法としては、公知の方法を利用することができる。例えば、げっ歯類においては、胎仔細胞の初代培養の方法（新生化学実験講座、18 巻、125 頁～129 頁東京化学同人、およびマウス胚の操作マニュアル、262 頁～264 頁、近代出版）に従って細胞株を樹立することが可能である。

本発明の遺伝子改変動物、および該動物から樹立した細胞株は、例えば、C1Gal-T2 遺伝子の詳細な機能の解析に利用することができる。例えば、C1Gal-T2 遺伝子の発現を調節する化合物の作用機序の解析等に利用することができる。遺伝子改変動物の組織から樹立された細胞を用いることで、各組織における被検化合物の作用をより詳細に検討することが可能である。

さらに本発明は、本発明の C1Gal-T2 タンパク質の活性もしくは発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明の好ましい態様においては、本発明の遺伝子改変非ヒト動物または本発明の細胞における、C1Gal-T2 タンパク質の活性もしくは発現量の変化を指標とするスクリーニング方法である。この方法においては、まず、被検化合物を本発明の遺伝子改変非ヒト動物に投与する、または、本発明の細胞と被検化合物を接触させる（工程（a））。

本方法に用いる被検化合物としては、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物等を挙げることができる。

上記工程（a）における、本発明の遺伝子改変動物への被検化合物の投与は、



例えば、経口的に、または注射等により行うことができるが、それらに限定されない。被検化合物がタンパク質である場合には、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を有するウイルスベクターを構築し、その感染力を利用して、本発明の遺伝子改変動物に該遺伝子を導入することも可能である。

上記方法における「接触」は、通常、本発明の細胞の培養液に被検化合物を添加することによって行うが、この方法に特に限定されない。被検化合物がタンパク質等の場合には、例えば、該タンパク質を発現する DNA ベクターを、該細胞へ導入することにより、「接触」を行うことができる。

上記方法においては、次いで、本発明の上記遺伝子改変動物もしくは細胞における C1Gal-T2 タンパク質の活性または発現量を測定する（工程（b））。

上記「活性」とは、通常、ガラクトース転移活性である。この活性は、上述の方法によって測定することができる。

また、本方法における発現量の測定は、当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば、C1Gal-T2 遺伝子を発現する本発明の細胞、あるいは、本発明の遺伝子改変動物の細胞から mRNA を定法に従って抽出し、この mRNA を鋳型としたノーザンハイブリダイゼーション法または RT-PCR 法を実施することによって該遺伝子の転写レベルの測定を行うことができる。また、C1Gal-T2 遺伝子を発現する細胞からタンパク質画分を回収し、C1Gal-T2 タンパク質の発現を SDS-PAGE 等の電気泳動法で検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うこともできる。さらに、C1Gal-T2 タンパク質に対する抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法を実施することにより該タンパク質の発現を検出することにより、遺伝子の翻訳量の測定を行うことも可能である。C1Gal-T2 タンパク質の検出に用いる抗体としては、検出可能な抗体であれば、特に制限はないが、例えばモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体の両方を利用することができる。

本発明においては、次いで、被検化合物を投与していない場合と比較して、本発明の C1Gal-T2 タンパク質の活性もしくは発現量を変化させる化合物を選択す

る（工程（c））。このようにして選択された化合物は、本発明のタンパク質の活性の変化に起因する疾患の治療または予防のための医薬品候補化合物となるものと期待される。上記の「疾患」としては、IgA腎症、またはTn症候群等を挙げることができるが、本発明のタンパク質の発現量または活性の変化に起因する疾患であれば、特にこれらに限定されない。本発明のスクリーニング方法によって取得される化合物もまた本発明に含まれる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ClGal-T2 cDNAの塩基配列、および該配列によってコードされるアミノ酸配列を示す図である。推定膜貫通ドメインを四角で囲み、ポリアデニル化シグナルは下線で示した。アスパラギンにリンクしたグリコシル化サイトを二重下線で示し、矢印はスプライシングサイトを示す。

図2は、ClGal-T2とClGal-T1のアミノ酸配列の比較を示す図である。保存されたシステイン残基を四角で囲んだ。

図3は、TLCプレートをイメージアナライザーFLA3000で測定した結果を示す写真である。

図4は、11-GalNAc-HPから由来する反応産物のHPLC解析の結果を示す図である。Cy5-ラベル化11-GalNAc-HPの溶出位置は、ピークSとして示した（パネルA）。パネルBは、LSC-ClGal-T2細胞ライセートおよび残りの基質（ピークS）のミクロソーム画分の反応生成物（ピークP）を示す。 $\beta$ 1,3-ガラクトシダーゼによる消化後の反応生成物（ピークP）をパネルCに示す。

図5は、ヒトClGal-T2でトランスフェクトしたLSC細胞のフローサイトメトリ解析の結果を示す図である。LSC-hClGal-T2トランスフェクタントの表面のT関連抗原の発現をフローサイトメトリによって解析した。各パネルの薄い線は、各種レクチンまたは抗体により染色したLSC細胞でmockトランスフェクトした結果を示す。各パネルは、(A)PNAレクチン、(B)HBSTn1(STn)、および(C)H

B-T1 (Tn)で染色したLSC細胞のステーブルトランスフェクタントを示す。

図6は、リアルタイムPCRによる種々のヒト細胞におけるヒトC1Gal-T2転写物の定量解析の結果を示す図である。C1Gal-T2およびGAPDHの標準曲線は、各プラスミドの希釈系列によって作成した。C1Gal-T2転写物の発現レベルは、GAPDH転写物の発現レベルで標準化した。

図7は、糖転移酵素の8種類のコア構造を示す図である。

図8は、各種細胞株およびLSC-C1Gal-T2におけるGalNAc- $\alpha$ -pNpに対するコア1合成活性(A)とC1Gal-T1とC1Gal-T2の転写発現量(B)を示す写真および図である。

図9は、AはC1Gal-T1-2配列と、K562、LSB、LSC、Jurkatの各配列との比較を模式的に示す図である。BはLSBとLSC、CはLSBとJurkatとの比較を示す図である。

図10は、C1Gal-T3とC1Gal-T2のアミノ酸配列の比較を示す図である。

図11は、定量的PCRによる種々のヒト組織におけるヒトC1Gal-T3転写物の定量発現解析の結果を示す図である。定量の標準遺伝子としてはGAPDH遺伝子を使用し、既知濃度の鋳型DNAにより定量の検量線を作成し該遺伝子の発現量の標準化を行った。

図12は、血球細胞におけるC1Gal-T3の発現を示す図である。リアルタイムPCRによるヒト末梢血単核球、B細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞各画分におけるヒトC1Gal-T3転写物の定量解析の結果を示した。末梢血単核球は健常者ボランティア全血よりFicolを用いて分離した。B細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞各画分は、末梢血単核球より、それぞれanti-CD19、anti-CD4、anti-CD8抗体が結合されたビーズを用いて得た。C1Gal-T3およびGAPDHの標準曲線は、各プラスミドの希釈系列によって作成した。C1Gal-T3転写物の発現レベルはGAPDH転写物の発現レベルで標準化した。対照(control)として、比較的C1Gal-T3の発現量が高い精巣についても、同時に測定を行った。

図13は、血球細胞における C1Gal-T1, -T2, -T3 の発現を示す図である。C1Gal-T1, -T2 についても、上記 C1Gal-T3 と同様に転写物の定量解析を行い、三者を比較した。

図14は、ヒト B 細胞由来各種細胞株における C1Gal-T3 の発現を示す図である。B 細胞で C1Gal-T3 の発現が認められたため（図12、13）各種細胞株におけるヒト C1 Gal-T3 転写物の定量解析をリアルタイム PCR にて行った。

図15は、ヒト B 細胞由来各種細胞株における C1Gal-T1, -T2, -T3 の発現を示す図である。C1Gal-T1, -T2 についても、上記 C1Gal-T3 と同様に転写物の定量解析を行い、三者を比較した。

図16は、COS-1 細胞への C1Gal-T3 トランスフェクションの結果を示す写真である。pFLAG-CMV3-C1 Gal-T3 をトランスフェクトした COS-1 細胞の培養上清より、anti-FLAG 抗体を結合した M1 アガロースにて精製した C1Gal-T3 の SDS-PAGE の結果を写真に示した。HRP-anti-FLAG 抗体は x1000 希釈したものをを用いて、ゲルは 12.5% アクリルアミドゲルを使用した。1 から 5 までの各レーンについては図の下に説明を付けた。

左の図が、anti-FLAG 抗体でのウェスタンブロット、右の図がクマシー染色の結果を示す。

図17は、COS-1-C1 Gal-T3 トランスフェクタントの GalNAc-peptide に対するコア1合成活性を HPLC で解析した結果を示す図である。図中の HP は IgA1 ヒンジ部位のアミノ酸配列を模した合成ペプチドを示し、4-, 7-, 等の数字は GalNAc が付加しているアミノ酸の位置を示す。例えば、4-GalNAc-HP は、N 末から 4 番目のアミノ酸に GalNAc が付加した IgA1 ヒンジペプチドである。ただし、5xGalNAc-HP は 4-, 7-, 9-, 11-, 15- の 5 箇所すべてに GalNAc が結合したペプチドである。酵素源として上段から COS-1-pFLAG-CMV3-C1 Gal-T3 トランスフェクタント培養上清より FLAG tag で精製した C1Gal-T3、COS-1-pFLAG-CMV3 トランスフェクタント（ベクターのみの mock トランスフェクタント）培養上清の FLAG t

ag 精製画分、Core 1 合成活性を有する細胞株 LSB の細胞抽出液（ポジティブコントロール）、Core 1 合成活性をもたない細胞株 LSC の細胞抽出液（ネガティブコントロール）を用いた結果を示した。受容体として、蛍光標識した GalNAc-Ser を用いた。図の右側はドナー基質を添加せずに酵素反応を行ったコントロールであり、図中 S はアクセプター基質ピークを、P は酵素反応の結果検出された生成物ピークを示す。

図 18 は、酵素源として、すべて COS-1-pFLAG-CMV3-C1 Gal-T3 トランスフェクタント培養上清より FLAG tag で精製した C1 Gal-T3 を用いて、HPLC 解析を行った結果を示す図である。クロマトグラムの左側にアクセプター基質を示した。

図 19 は、C1 Gal-T1, 2, 3 の基質特異性の比較をした結果を示す図である。LSC-C1 Gal-T1, LSC-C1 Gal-T2 のマイクロゾーム画分、COS-1-C1 Gal-T3 由来の精製酵素を酵素源として、各アクセプター基質に対するコア 1 合成活性を解析した。

図 20 は、C1 Gal-T1, 2, 3 の共発現結果を示す写真である。C1Gal-T1, 2, 3 を図に示した組み合わせで 293T 細胞に共発現させ、培養上清および細胞より精製した C1Gal-T1, 2, 3 の anti-FLAG 抗体によるウェスタンブロットを行った。anti-FLAG 抗体は x1000 に希釈したものをを用いた。

図 21 は、C1Gal-T1, 2, 3 の共発現 293T トランスフェクタントを用いたコア 1 合成活性の解析結果を示す図である。各 293T トランスフェクタントの培養上清より精製した C1Gal-T を酵素源に、GalNAc-peptide に対するコア 1 合成活性を HPLC にて解析した。アクセプター基質 ; IgA hinge peptide attached one GalNAc, N.C. : ドナー基質なし。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

## 〔実施例1〕 新規ガラクトース転移酵素 ClGal-T2 の同定

Ju らによってデータベース登録された Core1  $\beta$ 1,3-Gal-T1 (AF155582) をクエリーにして公共のデータベースを検索したところ、相同性をもつ遺伝子が登録されていた。この遺伝子は、ゲノム配列 (AC011890 (Xq23)) および cDNA 配列 (AF150268, BC011930) の両方が登録されているが、それぞれの配列の不一致がわずかではあるが存在するため、cDNA ライブラリーからのクローニングを選択した。用いたサンプルは常法 (Yuzuru Ikehara, Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999) により作製したヒト大腸腺癌細胞株 Colo205 cDNA ライブラリーである。また、スクリーニング手法はラジオアイソトープを使用した一般的な核酸プローブによる方法を用いた。

まず、ヒト大腸腺癌細胞株 Colo205 cDNA ライブラリーより常法に従って調製したラムダファージを鋳型とし、プライマー CB-739 (5'-gaagatctag aatgcaccac catgagcatc - 3' / 配列番号: 3) と CB-740 (5'-ataagaatgc ggccgctcag tcat tgtcag aaccatttg- 3' / 配列番号: 4) を用いて PCR を行い、増幅した DNA 断片 878 bp をアマシャム社製 Multiple DNA labeling system を用いて  $^{32}\text{P}$ -dCTP で放射能ラベルした。このプローブを用いて、大腸菌上に形成されたラムダファージのプラークのうち、プローブとハイブリダイゼーションする単一のプラークを拾い、上記プライマー CB-739 と CB-740 を用いて PCR で目的とする DNA 部位の存在を確認した。挿入が確認されたプラークより得られたファージはラムダ ZAP II ベクター (ストラタジーン社) で構築されているため (Yuzuru Ikehara, Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999)、付属の説明書に従った方法により pBluescript SK-ベクターに挿入された cDNA クローンとして調製 (Excision) することが出来る。同方法によりこれを調製し、得られたコロニーより DNA を得た。この cDNA クローンは、SK-/C2 と名付けた。その後、通常の方法に従って cDNA クローンの 1471 bp の塩基配列を決定した

(配列番号：1；以下「配列1」という)。理論上の ORF 957bp が得られ、この ORF から 318 アミノ酸が推定され C1Gal-T2 と名づけた (配列番号：2) (図 1)。また、104 bp の 5' 非翻訳領域と 410 bp の 3' 非翻訳領域が存在しており、ポリ(A)の付加は見られなかった。アミノ酸配列によりほとんどの糖転移酵素に見られる典型的な 2 型の膜タンパク質であることが予想された。配列 1 と AC011890 で登録されたゲノム配列を比較検討したところ、ORF、ATG から上流 5 bp と 3' 非翻訳領域はひとつのエキソンからなり、99 bp の 5' 非翻訳領域との間には 2746 bp のイントロンが存在した。このエキソン-イントロンのスプライス部位は GU-AG 則に従っていた。よってこの C1Gal-T2 は、少なくとも 2 つのエキソンから構成されていた。アクセッション No. BC011930 でほぼ同等の長さの cDNA 配列が登録されていたが、この cDNA の 3' 末端にはポリ A が付加されている。しかし配列 1 よりもポリ A 配列を除いて 250 bp 短いことから、3' 非翻訳領域に選択的ポリ A シグナル付加の mRNA のアイソフォームが存在することが示唆された。クエリーに使用した C1Gal-T1 と C1Gal-T2 のアミノ酸配列の比較をすると、ホモロジーが 30%に満たないのかかわらず 7 カ所のシステイン残基がすべて保存されていた。しかし、2 価カチオンの結合部位とされる Dx D 配列は、両遺伝子ともに存在してはいるが位置は異なるものであった (図 2)。

#### 〔実施例 2〕 C1Gal-T2 の発現ベクターへの組込み

(a) C1Gal-T2 の発現系を作成するため、まず C1Gal-T2 の ORF 全長をインビトロジェン社の Gateway システムの pDONR201 に組込み、さらにインビトロジェン社の pDEST12.2 に組み替えた。

(b) Gateway システムによる pDONR201 への組込み

(i) エントリークローンの作成

SK-/C2 を鋳型としてプライマー F (CB-760 : 5'-ggggacaagt ttgtacaaaa aagca

ggcctt agaaggagat agaaccatgc ttcttgaaag cagctcc-3' / 配列番号 : 5) とプライマー R (CB-761 : 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaatcatgtgcagaacct-3' / 配列番号 : 6) により PCR (94℃15 秒、60℃30 秒、68℃1 分を 15 サイクル) により再度 DNA 断片を得た。目的の断片をゲルから切りだし、精製後 BP クロナーゼ反応によって pDONR201 へ組込み、「エントリークローン」を作成した。反応は目的とする DNA 断片 5  $\mu$ l、pDONR201 1  $\mu$ l (150 ng)、反応緩衝液 2  $\mu$ l、BP クロナーゼ mix 2  $\mu$ l を 25℃で 1 時間インキュベートして行った。プロテイナーゼ K を 1  $\mu$ l 加えて 37℃10 分おき反応を終了させた。

その後上記 mix 全量 (11  $\mu$ l) をコンピテントセル (大腸菌 DH5  $\alpha$ ) 100  $\mu$ l と混合し、ヒートショック法の後、カナマイシンを含む LB プレートにまいた。翌日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認し、プラスミド DNA (pDONR-C2) を抽出・精製した。

#### (i i) 発現クローンの作成

上記エントリークローンは挿入部位の両側にラムダファージが大腸菌から切り出される際の組換部位である attL を持つもので、LR クロナーゼ (ラムダファージの組換酵素 Int、IHF、Xis を混合したもの) とデステイネーションベクターと混合することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローンが作成される。具体的工程は以下のとおりである。

まずエントリークローン 1  $\mu$ l、pDEST12.2 を 0.5  $\mu$ l (75ng)、LR 反応緩衝液 2  $\mu$ l、TE4.5  $\mu$ l、LR クロナーゼ mix 2  $\mu$ l を 25℃で 1 時間反応させ、プロテイナーゼ K を 1  $\mu$ l 加えて 37℃10 分インキュベートして反応を終了させた (この組換え反応で pDEST12.2-C2 が生成される)。pDEST12.2 は、インビトロジェン社で市販されているネオマイシン耐性遺伝子をもつ動物細胞発現用ベクターである。

その後上記混合液全量 (11  $\mu$ l) をコンピテントセル (大腸菌 DH5  $\alpha$ ) 100  $\mu$ l



と混合し、ヒートショック法の後、アンピシリンを含む LB プレートにまいた。翌日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認し、ベクター (pDEST12.2-C2) を抽出・精製した。

〔実施例 3〕 大腸癌細胞株 LSC への pDEST12.2-C2 をトランスフェクション

大腸癌細胞株 LSC は、Core1 合成活性 (GalNAc に対しての  $\beta$ 1,3Gal-T 活性) を持たず、細胞表面のタンパク質上に GalNAc (Tn 抗原; GalNAc-Ser/Thr) をもつ細胞株である。この細胞株に pDEST12.2-C2 をトランスフェクトすることにより C1Gal-T2 を強制発現させ、その細胞溶解物を酵素源にして、Core1 合成活性を検出した。大腸癌細胞株 LSC の培養は、10%ウシ胎児血清-RPMI-1640 培地 (インビトロジェン社) (ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml)/ペニシリン (100 単位/ml)/L-グルタミン (0.292 mg/ml)) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。トランスフェクション前日に 1.2x10<sup>6</sup> 細胞/2 ml を 6 穴ディッシュにまいた。このとき、ストレプトマイシンおよびペニシリンを除いた培地に移しかえた。細胞をまいて、次の日にトランスフェクションを実施した。Opti-MEM (インビトロジェン社) 250  $\mu$ l に対して Lipofectamine2000 (インビトロジェン社) 10  $\mu$ l 加え、室温で 5 分間インキュベートした。それに Opti-MEM 250  $\mu$ l に対して pDEST12.2-C2 10  $\mu$ g を混合したものと混ぜ、室温で 20 分間インキュベートした。合計 500  $\mu$ l を前日まいた細胞に滴下した。トランスフェクションして 2 日後、細胞をトリプシン (0.25%) -EDTA (1 mM) (インビトロジェン社) で剥がした。細胞は二分し、ひとつは新しいディッシュにまきなおし、もうひとつは一過性発現での活性測定用にリン酸緩衝液で 2 回洗浄後、-80°C に保存した。まきなおした細胞は次の日にジェネティシン (インビトロジェン社) を最終濃度 0.6 mg/ml になるように加えた。この安定導入株を LSC-C1Gal-T2 と名付けた。

〔実施例 4〕 C1Gal-T2 の受容体基質の探索

C1Gal-T2 は、約 100 種類の既存の糖転移酵素遺伝子と比較して最も Core1 Gal1-T1 に相同性は高いので、core1  $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素類に分類した。そこで、第一に糖供与体基質として UDP-Gal を用いて検討した。

以下の反応系を用いて、C2 の受容体基質を調べた。下記反応液の「受容体基質」には、pNp- $\alpha$ -GalNAc および pNp- $\beta$ -GalNAc (すべてシグマ社)を用いてそれぞれが受容体として機能するかどうかを調べた。

反応液 (カッコ内は最終濃度) は受容体基質 (10 nmol)、HEPES 緩衝液 (pH7.4) (14 mM)、MnCl<sub>2</sub> (12.5 mM)、UDP-Gal (250  $\mu$ M)、UDP-[<sup>14</sup>C]-Gal (175 nCi)、から成り、これに酵素液を 5  $\mu$ l 加えて、さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 20  $\mu$ l とした。酵素液は、5  $\times$  10<sup>6</sup> 個の細胞あたり 50 ml の細胞破碎用緩衝液 (HEPES 緩衝液 (pH 7.4) (20 mM), NaCl (154 mM), TritonX-100 (1%)) に懸濁し、水槽式の超音波破碎装置で 4℃、15 分インキュベート後、遠心してその上清を使用した。上記反応混合液を 37℃ で 2 時間反応させ、反応終了後、H<sub>2</sub>O を 200  $\mu$ l 加え、軽く遠心後上清を取得した。10 ml のメタノールで 1 回洗浄後、10 ml の H<sub>2</sub>O で 2 回洗浄して平衡化した Sep-Pak plus C18 Cartridge (Waters) に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。10 ml の H<sub>2</sub>O にて 2 回カートリッジを洗浄後、5 ml のメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を 40℃ のヒートブロックにて加熱しながら、窒素ガスを吹き付け蒸発乾固させた。これに、メタノール 20  $\mu$ l を添加し、TLC プレート (HPTLC plate Silica gel 60: MERCK 社製) にプロットし、クロロホルム: メタノール: 水 (0.2% CaCl<sub>2</sub> 含む) = 55: 45: 8 の組成からなる展開溶媒を用いて展開した。TLC プレートの上端から 5 mm の所まで展開し、プレートを乾燥後、バイオ・イメージアナライザー FLA3000 (富士写真フイルム社製) を用いて生成物に取り込まれている放射線の量を測定した。

その結果、LSC-C1Gal-T2 細胞抽出液で pNp- $\alpha$ -GalNAc には強い反応が示され、pNp- $\beta$ -GalNAc に反応しないことから、C1Gal-T2 がガラクトース  $\beta$ 1-3 アセチル

ガラクトサミニル  $\alpha$ 1-R の合成酵素であることが示唆された (図3)。

〔実施例5〕 N-アセチルガラクトサミニル-ペプチド (GalNAc  $\alpha$ 1-peptide) を受容体基質とした活性の確認

上記の実験で C1Gal-T2 がコア1糖鎖 (ガラクトース  $\beta$ 1-3N-アセチルガラクトサミニル  $\alpha$ 1-R) の合成酵素であることが示唆されたため、様々な GalNAc  $\alpha$ 1-peptide を受容体基質として再度上記実験を行ったところ、pNp- $\alpha$ -GalNAc に対する場合と同様の反応が示された。

GalNAc  $\alpha$ 1-peptide 受容体基質に対するガラクトース転移酵素活性を調べるために以下の方法で受容体基質を調整した。

ヒト IgA1 のヒンジ領域のペプチド配列 HP (VPSTPPTPSPSTPPTSPSPS/配列番号: 7) の 4、7、9、11、または 15 番目の S または T の-OH 基に GalNAc を 1 つ導入したペプチドおよび 4、7、9、11、15 番目の S または T の-OH 基に GalNA を 1 つずつ導入したペプチドを合成した (ペプチド研究所社)。合成したペプチドは 4-GalNAc-HP (VPST (GalNAc) PPTPSPSTPPTSPSPS)、7-GalNAc-HP (VPSTPPT (GalNAc) PSPSTPPTSPSPS)、9-GalNAc-HP (VPSTPPTPS (GalNAc) PSTPPTSPSPS)、11-GalNAc-HP (VPSTPPTSPSPS (GalNAc) TPPTSPSPS)、15-GalNAc-HP (VPSTPPTPSPSTPPT (GalNAc) PSPS)、4、7、9、11、15-GalNAc-HP (VPST (GalNAc) PPT (GalNAc) PS (GalNAc) PS (GalNAc) TPPT (GalNAc) PSPS) と命名した。さらに、受容体基質となる各種 GalNAc-HP は、 $H_2O$  に溶かして、ジメチルホルムアミドに溶かした Cy5 と 1 : 10 のモル比となるように混合して、4℃で一晩 Cy5 標識反応を行った。反応液は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (カラムには CAPCELL PAK  $C_{18}$  UG120 (資生堂社) を、分離バッファーには 0.1% トリフルオロ酢酸を使用し、15 から 30% のアセトニトリル濃度勾配で溶出した。また、流速は 1 ml/min で行い、検出条件は励起波長: 649 nm、蛍光波長: 670 nm とした) による精製を行った。Cy5 の蛍光を指標に、Cy5 標識された各種 GalNAc-HP (4-GalNAc-HP-C

y5、7-GalNAc-HP-Cy5、9-GalNAc-HP-Cy5、11-GalNAc-HP-Cy5、15-GalNAc-HP-Cy5、4、7、9、11、15-GalNAc-HP-Cy5) は各々保持時間 35.2 分、34.4 分、35.1 分、34.9 分、34.6 分、31.1 分での単一基質ピークとして基質を分取した。分取した基質は凍結乾燥により濃縮した。このように調整した基質は 4-GalNAc-HP-Cy5、7-GalNAc-HP-Cy5、9-GalNAc-HP-Cy5、11-GalNAc-HP-Cy5、15-GalNAc-HP-Cy5、4、7、9、11、15-GalNAc-HP-Cy5 と命名した。

FITC 標識されたヒトの消化器官由来のムチンペプチド配列 FITC-MUC1a' (FITC-AHGVTSPDTR)、同じく FITC 標識されたラットの顎下腺ムチンペプチド配列 EA2-FITC (PTTDSTTPAPTTK-FITC) を合成した (サワディー・テクノロジー社)。さらに、FITC-MUC1a'、EA2-FITC ペプチドを受容体基質として、既知の UDP-N-アセチル-D-ガラクトサミン：ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc-T6 または GalNAc-T10) と反応させた。反応液を HPLC (カラムには 5C<sub>8</sub>-AR Code No. 378-66 (COSMOSIL 社) を、分離バッファーには 0.05% トリフルオロ酢酸を使用し、0 から 50% のアセトニトリル濃度勾配で溶出した。また、流速は 1 ml/min で行い、検出条件は励起波長：492 nm、蛍光波長：520 nm とした) 分析し、受容体基質 FITC-MUC1a' ピーク (保持時間 19.6 分) と 0.8 分差を示す単一の産物ピーク (保持時間 18.8 分)、および、受容体基質 EA2-FITC ピーク (保持時間 20.3 分) と 0.7 分差を示す単一の産物ピーク (保持時間 19.6 分) を分取し、凍結乾燥後、一部を MALDI-Mass (BRUKER 社、機種：REFLEX) で分析し、両産物が受容体基質に GalNAc が 1 つ転移されたものであることを確認した。このように調整した基質は FITC-MUC1a'-GalNAc、EA2-GalNAc-FITC と命名した。

反応液 (カッコ内は最終濃度) は受容体基質 (5 pmol)、MES 緩衝液 (pH 6.5) (100 mM)、MnCl<sub>2</sub> (20 mM)、ATP (2 mM)、UDP-Gal (0.5 mM)、から成り、これに LSC-C1Gal-T2 の酵素源を 5  $\mu$ l 加えて、さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 20  $\mu$ l とした。

上記反応混合液を 37°C で 8 時間反応させ、反応終了後、H<sub>2</sub>O を 60  $\mu$ l 加え、軽

く遠心後上清を取得した。この上清をウルトラフリー-MC カラム（ミリポア社）で精製し、30  $\mu$ l を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。カラムには CAPCELL PAK C<sub>18</sub> UG120（資生堂社）を、分離バッファーには 0.1% トリフルオロ酢酸を使用し、15 から 30% のアセトニトリル濃度勾配で溶出した。また、流速は 1 ml/min で行った。

前記の細胞破碎用緩衝液で調整したものを酵素源とした場合、GalNAc  $\alpha$ 1-peptide を受容体基質のペプチドの分解が起こり、HPLC 解析で多数のピークが検出されてしまう。よって GalNAc  $\alpha$ 1-peptide を受容体基質として使用する場合、LSC-C1Gal-T2 トランスフェクタントからミクロソーム画分を調整し、酵素源として使用した。この場合、ペプチドの分解を抑えられ、目的の生成物が HPLC によって単一ピーク検出が可能であった。

ミクロソーム画分の調整法は、以下に示す。

1x10<sup>8</sup> 個の細胞株を 1 ml の 0.25 M スクロース/10 mM Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁し、100  $\mu$ l のプロテアーゼインヒビターカクテル（シグマ社）を加える。ダウンスのホモジナイザーに細胞懸濁液を移し、200 回ストロークして細胞を破碎する。1,000 x g で 4℃、10 分間遠心して上清を回収する。その上清を 10,000 x g で 4℃、20 分間遠心して上清を回収する。その上清を 105,000 x g で 4℃、1 時間遠心して沈殿をミクロソーム画分として回収し、適量の 0.25 M スクロース/10 mM Tris-HCl (pH 7.4) に溶解し酵素源として使用した。

その結果、11-GalNAc-HP-Cy5 を受容体基質、UDP-Gal を供与体基質に用いた場合に、その反応産物は 28.8 分に新たなピークとなって現れた。（図 4A, B）

〔実施例 6〕 ガラクトースと N-アセチルガラクトサミニル  $\alpha$ 1-R との結合様式の解析

ガラクトースと N-アセチルガラクトサミンがどのような結合様式であるかをグリコシダーゼ処理によって確認した。LSC-C1Gal-T2 によって 11-GalNAc-HP-Cy5

にガラクトースが転移された反応産物を  $\beta$ 1,3-ガラクトシダーゼ（明治乳業）で処理して、ガラクトースが転移した 11-GalNAc-HP-Cy5 のピークがもとの 11-GalNAc-HP-Cy5 のピークに移ることを HPLC で確認できたので、C1Gal-T2 は、GalNAc  $\alpha$ 1-ペプチドの GalNAc の非還元末端に  $\beta$ 1,3 結合でガラクトースが転移する core1 合成酵素であることが *in vitro* で証明された。（図 4C）

#### 〔実施例 7〕 培養細胞株の細胞表面の糖タンパク質の糖鎖構造の解析

大腸癌細胞株 LSC は、Core1  $\beta$ 1-3 ガラクトース転移酵素活性が検出されない。よってこの細胞表面には、Tn 抗原および STn 抗原の発現が見られる。この細胞株に C1Gal-T2 の安定導入株（LSC-C1Gal-T2）を作製し、細胞表面上の糖鎖抗原の変化をフローサイトメーターで解析した。LSC-C1Gal-T2 の作製法は上記に記述済みである。細胞は、トリプシン（0.25%）-EDTA（1 mM）によってディッシュから剥がし、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%アザイド/リン酸緩衝液によって細胞を洗浄した。1x10<sup>5</sup>個の細胞をコア 1 構造を認識する FITC ラベルされた Peanut agglutinin レクチン（PNA-FITC；EY Laboratories, Inc.）、HB STn1（抗シアリル Tn 抗原モノクローナル抗体、マウス IgM；DAKO）、HB-T1（抗 Tn 抗原モノクローナル抗体、マウス IgG1；DAKO）で染色した。PNA-FITC は、50  $\mu$ g/ml、HB STn1 および HB-T1 は、100 倍希釈して細胞と 4℃で 30 分間反応させた。0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%アザイド/リン酸緩衝液によって 2 回細胞を洗浄後、HB STn1 および HB-T1 で染色した細胞に対して、FITC ラベルの二次抗体（抗マウス IgG 抗体、抗マウス IgM 抗体は共に 1,000 倍希釈）と 4℃で 30 分間反応させた。0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%アザイド/リン酸緩衝液によって 2 回細胞を洗浄後、0.5%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液で固定し、FACSCaliber（ベクトンディッキンソン社）にて FITC の強度を測定した。LSC-C1Gal-T2 は、LSC 細胞と比べ PNA で染色性が増加し、Tn およびシアリル Tn 抗原の染色性の低下が見られた（図 5）。LSC 細胞表面上の Tn 抗原は C1Gal-T2 の作用によってガラクトースが転移され T

抗原になり、シアリル Tn 抗原も C1Gal-T2 が内因性のシアル酸転移酵素との競合作用に打ち勝つことにより減少し、T 抗原が発現したと考えられた。この結果から C1Gal-T2 は、細胞内においても Core1 合成酵素であることが証明された。

#### 〔実施例 8〕 ヒト種々組織及び株化細胞での発現

ヒト正常組織及び株化細胞の cDNA を用いて、定量的 PCR により該遺伝子の発現量を定量した。正常組織の cDNA としてはクロンテック社の Marathon Ready cDNA を使用し、株化細胞に関しては総 RNA を抽出し、常法により cDNA を作製し使用した。C1Gal-T2 の定量的発現解析に使用したプライマーは C2-RT-FP1 (5'-gtttgcctga aatatgctgg agtat-3' / 配列番号 : 8)、C2-RT-RP3 (5'-caacagcctt ctactacctg gttg -3' / 配列番号 : 9)、プローブは C2-RT-MGB1 (5'-cagaaaatgc agaagatgct gatggaaaag atgta-3' / 配列番号 : 10) である。なお、C2-RT-MGB1 プローブにはアプライドバイオシステムズ社のマイナーグループバインダーを結合したものを使用した。酵素及び反応液には Universal PCR Master Mix を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (ともにアプライドバイオシステムズ社) により反応液量 25  $\mu$ l で定量を行った。定量の標準遺伝子としてはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子を使用し、既知濃度の鋳型 DNA により定量の検量線を作成し該遺伝子の発現量の標準化を行った。反応温度は 50℃2 分、95℃10 分のあと、95℃15 秒・60℃1 分を 50 サイクル行った。結果を図 6 に示した。

#### 〔実施例 9〕 C1Gal-T2 変異体の解析

ヒト細胞株である LSC および Jurkat 細胞は、コア 1 合成活性を持たないことが知られている。この 2 つの細胞株の C1Gal-T1 および C1Gal-T2 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量したところ、コア 1 合成活性を持つ細胞株 LSB および K562 細胞と同レベルの発現を確認した (図 8)。

これらの4つの細胞株のゲノム DNA および cDNA から、PCR によって C1GalT-1 および C1Gal-T2 遺伝子を増幅し、直接シーケンス法によって核酸配列を決定した。C1Gal-T1 の cDNA からの増幅プライマーには、5'- AGAAATACACTTTCGGGAA -3' (配列番号: 11) と 5'- TGCAGTGCTAGACATATTAC -3' (配列番号: 12) を使用し、C1Gal-T2 の cDNA からの増幅プライマーには、5'- GCTTTCCTGTCCCCAAGCCG TTC -3' (配列番号: 13) と 5'- GCCCCACAGATTTCTAATGTTC -3' (配列番号: 14) を使用した。また、C1Gal-T2 のゲノム DNA からの増幅プライマーには、5'- GTAATCAGATTCCATTGGAAGC -3' (配列番号: 15) と 5'- GCCCCACAGATTTCTAATGT TC -3' (配列番号: 14) を使用した。

C1GalT-1 の配列は、4つの細胞株の cDNA およびゲノム DNA ですべて登録された配列と同一であった。コア 1 合成活性を持つ LSB および K562 細胞の C1Gal-T2 の配列は、cDNA およびゲノム DNA 共にコア 1 合成活性の確認された配列と同一であった (図 9A)。LSC 細胞の C1Gal-T2 の配列は、開始コドンの ATG の A を 1 とした時の 53 番目の T と 54 番目の C の間に T が 1 つ挿入されていた (図 9B)。このことによりフレームシフトが生じ、途中終止コドンが出現した。Jurkat 細胞の C1Gal-T2 の配列は、428 番目の C が T に変わり、アミノ酸がアラニンからバリンに変わるミスセンス変異と 468 番目の T が欠失していた (図 9C)。この場合もフレームシフトが生じ、途中終止コドンが出現した。

C1GalT-2 遺伝子は、X 染色体上にあり、男性の場合はこの遺伝子をもつアリルは 1 本であり、女性の場合は、2 本である。Jurkat 細胞は、男性由来の細胞株であり、1 本の X 染色体上の不活性型の C1Gal-T2 が存在することになる。LSC の場合、どちらかわからないが、cDNA およびゲノムで C1Gal-T2 配列に変異のあるものしか見つからなかった。

以上より LSC および Jurkat 細胞では C1Gal-T2 が不活性型のためコア 1 合成活性を示さないことが判明した。また、C1Gal-T1 が、mRNA の発現があるのに酵素活性を検出することができなかったことにより、C1Gal-T2 がより比活性が強い



コア1合成酵素であることが示唆された。

〔実施例10〕 新規ガラクトース転移酵素 C1Gal-T3 の同定

本発明者らによって同定された C1Gal-T2 (AB084170) をクエリーにして、公共のデータベースを検索したところ、相同性をもつ配列が登録されていた。この遺伝子は、ヒトではゲノム配列情報でしか存在しておらず (AC011242, AC084264 (第2染色体))、ORF は一つのエキソンからなると予想され、C1Gal-T2 とアミノ酸レベルで 68% の相同性を持ち、システイン残基は、7 か所中 6 か所で保存されていた (図10)。この配列によってコードされる新規ガラクトース転移酵素を、本発明者らは C1Gal-T3 と名付けた。また、この遺伝子と 96% 相同性をもつクローンが *Macaca fascicularis* の精巢の cDNA クローン (AB071109) として登録されていた。

〔実施例11〕 C1Gal-T3 の発現ベクターへの組込み

(a) C1Gal-T3 の発現系を作成するため、まず C1Gal-T3 の ORF 全長をインビトロジェン社の Gateway システムの pDONR201 に組込み、さらにインビトロジェン社の pDEST12.2 に組み換えた。

(b) 次のようにして、Gateway システムによる pDONR201 への組込みを行った。

(i) エントリークロンの作成

Uterus より得られた cDNA (クロンテック社、Marathon-ready cDNA) を鋳型としプライマー F (C5GFSKD1 : 5' - ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcctt cgaaggagat agaaccatgg tticcgctag tgggacatc -3' / 配列番号 : 16) とプライマー R (C5G R : 5' - ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcagtcattt tctgaaccaa ctggag -3' / 配列番号 : 17) を用いて PCR (98℃10 秒、55℃30 秒、72℃1 分 30 秒を 30 サ

イクル) を行い DNA 断片を得た。目的の断片をゲルから切り出し、精製後 BP クロナーゼ反応によって pDONR201 へ組込み、「エントリークローン」を作成した。反応は目的とする DNA 断片 2  $\mu$ l、pDONR201 1  $\mu$ l (150 ng)、BP 反応緩衝液 2  $\mu$ l、BP クロナーゼ mix 2  $\mu$ l を 25℃ で 1 時間インキュベーションして行った。プロテイナーゼ K を 1  $\mu$ l 加えて 37℃、10 分間おき反応を終了させた。その反応混合液 1  $\mu$ l をコンピテントセル (大腸菌 DH5  $\alpha$ ) 50  $\mu$ l と混合し、ヒートショック法の後、カナマイシンを含む LB プレートに播いた。翌日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認し、プラスミド DNA (pDONR-C1GalT-3) を抽出、精製した。理論上の ORF 948 bp (配列番号: 18) が得られ、この ORF から 315 アミノ酸が推定された (配列番号: 19)。アミノ酸配列によりほとんどの糖転移酵素に見られる典型的な 2 型の膜タンパク質であることが予想された。

#### (i i) 発現クローンの作成

まずエントリークローン 1  $\mu$ l、pDEST12.2 を 1  $\mu$ l (150 ng)、LR 反応緩衝液 2  $\mu$ l、TE 4  $\mu$ l、LR クロナーゼ mix 2  $\mu$ l を 25℃ で 1 時間反応させ、プロテイナーゼ K を 1  $\mu$ l 加えて 10 分間、37℃ でインキュベーションし反応を終了させた。pDEST12.2 はインビトロジェン社から市販されているネオマイシン耐性遺伝子をもつ動物細胞発現用ベクターである。

その後上述反応混合液 1  $\mu$ l をコンピテントセル (大腸菌 DH5  $\alpha$ ) 50  $\mu$ l と混合し、ヒートショック法の後、アンピシリンを含む LB プレートに播いた。翌日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認し、ベクター (pDEST12.2-C1Gal-T3) を抽出、精製した。

〔実施例 12〕 C1Gal-T3 の FLAG タグつき融合タンパク発現ベクターへの組込み

pDONR-C1Gal-T3 の DNA を鋳型にしてプライマー F (TKC-7: 5' - gcccaagctt ca

cagaggtc aaactcaaga ccac -3' (配列番号：20) / 下線部はHindIIIの切断配列) とプライマーR (TKC-9 : 5' - cggaattctc agtcatttc tgaaccaact g -3' (配列番号：21) / 下線部はEcoRIの切断配列) を用いてPCR (98℃10秒、55℃30秒、72℃1分30秒を18サイクル) を行いDNA断片を得た。制限酵素処理 (HindIII-EcoRI) 後、目的の断片をゲルから切り出し、精製後DNAリガーゼ反応によってpFLAG-CMV-3ベクター (シグマ社) へ組込み、pFLAG-C1Gal-T3と名付けた。pFLAG-CMV-3ベクターは、5' からプレプロトリプシンの分泌シグナル、タグとしてFLAG配列を持っており、その3' 側に目的の遺伝子を挿入することによりリコンビナントタンパク質を作製することができる。糖転移酵素遺伝子の場合、アミノ末端に存在する膜貫通領域を除いたカルボキシル末端側 (酵素活性領域) を組み換えることによりその酵素の活性を持つものを得ることができるが知られている。

#### 〔実施例13〕 COS-1細胞へのpFLAG-C1Gal-T3の一過性トランスフェクション

pFLAG-C1Gal-T3のプラスミドDNAをCONCERT High Purity Plasmid Maxiprep System (インビトロジェン社) により大量に精製した。COS-1細胞の培養は、10%ウシ胎児血清-DMEM培地 (インビトロジェン社) (ストレプトマイシン(100  $\mu$ g/ml)/ペニシリン(100単位/ml)/) で37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。トランスフェクション前日に3x10<sup>6</sup>細胞/12 mlを9cmディッシュにまいた。このとき、ストレプトマイシンおよびペニシリンを除いた培地に移しかえた。細胞をまいて、次の日にトランスフェクションを実施した。Opti-MEM (インビトロジェン社) 1.5 mlに対してLipofectamine2000 (インビトロジェン社) 60  $\mu$  l加え、室温で5分間インキュベートした。それにOpti-MEM 1.5 mlに対してpFLAG-C1Gal-T3 30  $\mu$  gを混合したものと混ぜ、室温で20分間インキュベートした。合計3mlを前日まいた細胞に滴下した。トランスフェクションして2日後、培養上清を回収し使用

するまで-80℃に保存した。

〔実施例14〕 培養上清からのリコンビナント酵素の精製とその確認

10ml の培養上清に対して、100  $\mu$ l の抗 FLAG M1 モノクローン抗体-アガロースアフィニティーゲル、2 mM  $\text{CaCl}_2$ 、150 mM  $\text{NaCl}$ 、0.05%  $\text{NaN}_3$  になるように加え、回転板でレジンが混ざるように回転させながら 4℃で一晩吸着させた。1mM  $\text{CaCl}_2$  / TBS 緩衝液(50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM  $\text{NaCl}$ )で2回洗浄後、50  $\mu$ l の抽出バッファー(2mM EDTA/TBS 緩衝液)を加えた。その一部を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、そのタンパク質を Hybond-P ナイロンメンブレンに転写させた後、抗 FLAG M1 モノクローン抗体(シグマ社)によりウエスタン解析を行った。コニカイムノステイン HRP1000(コニカ社)により発色を行い、C1Gal-T3 のリコンビナント酵素は、約 40 kDa の位置に検出できた。

〔実施例15〕 C1Gal-T3 の N-アセチルガラクトサミニルーペプチド (GalNAc  $\alpha$ 1-peptide)を受容体基質とした活性の確認

COS-1 細胞で発現させた C1Gal-T3 のリコンビナント酵素を酵素源として、実施例5と同様に N-アセチルガラクトサミニルーペプチドを受容体基質として、ガラクトース転移酵素活性を測定した。その結果、4-GalNAc-HP に対してのガラクトース転移酵素活性が確認できた。

〔実施例16〕 ヒト種々組織での C1Gal-T3 転写産物の発現

ヒト正常組織のcDNAを用いて、定量的PCRにより該遺伝子の発現量を定量した。正常組織のcDNAとしてはクロンテック社の総RNAから、常法によりcDNAを作製し使用した。C1Gal-T3の定量的発現解析に使用したプライマーはC5-RT-FP1(5'-gccctgaaata tgcaggagtt ca -3' (配列番号: 22))、C5-RT-RP2(5'-ggttattaga caatgcctct tcaataag -3' (配列番号: 23))、プローブはC5-RT-MGB1(5-

'-FAM-gcagaaaatg cagaggatta tgaaggaaga gatgta-MGB-TAMRA-3' (配列番号: 24)) である。なお、C5-RT-MGB1プローブにはアプライドバイオシステムズ社のマイナーグループバインダーを結合したものを使用した。酵素及び反応液にはUniversal PCR Master Mixを使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (ともにアプライドバイオシステムズ社) により反応液量25 $\mu$ lで定量を行った。定量の標準遺伝子としてはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子を使用し、既知濃度の鋳型DNAにより定量の検量線を作成し該遺伝子の発現量の標準化を行った。反応温度は50℃2分、95℃10分のあと、95℃15秒・60℃1分を50サイクル行った。結果を図11に示した。

〔実施例17〕 リアルタイムPCRによるヒト種々組織でのC1 Gal-T1, T2, T3転写物の発現

リアルタイムPCRにより、ヒト末梢血単核球、B細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞各画分におけるヒトC1 Gal-T3転写物の定量解析を行った。末梢血単核球は健常者ボランティア全血よりFicolを用いて分離した。B細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞各画分は、末梢血単核球より、それぞれanti-CD19、anti-CD4、anti-CD8抗体が結合されたビーズを用いて得た。C1 Gal-T3およびGAPDHの標準曲線は、各プラスミドの希釈系列によって作成した。C1 Gal-T3転写物の発現レベルはGAPDH転写物の発現レベルで標準化した。対照(control)として、比較的C1 Gal-T3の発現量が高い精巣について、同時に測定を行った(図12)。

また、血球細胞におけるC1 Gal-T1、-T2、-T3の発現についても、上記C1 Gal-T3と同様に転写物の定量解析を行い、三者を比較した(図13)。

さらに、ヒトB細胞由来の各種細胞株を用いて、リアルタイムPCRにより、C1 Gal-T3転写物の定量解析を行った(図14)。B細胞でC1 Gal-T3の発現が認められた。また、ヒトB細胞由来各種細胞株におけるC1 Gal-T1、-T2、-T3の転写物の定量解析をリアルタイムPCRにて行い、三者を比較した(図15)。

#### 〔実施例 18〕 C1 Gal-T3 の COS-1 細胞へのトランスフェクト

COS-1 細胞へ C1 Gal-T3 をトランスフェクションした。pFLAG-CMV3-C1 Gal-T3 をトランスフェクトした COS-1 細胞の培養上清より、anti-FLAG 抗体を結合した M1 アガロースで精製した。12.5%アクリルアミドゲルを用いた。C1 Gal-T3 の SDS-PAGE の結果およびクマシー染色結果を図 16 に示す。

さらに、COS-1-C1 Gal-T3 トランスフェクタントの GalNAc-peptide に対するコア 1 合成活性を解析した。培養上清より精製した C1 Gal-T3 を用い、蛍光標識した N-acetylgalactosamine  $\alpha$ 1-0-Serine (GalNAc-Ser) または GalNAc-peptide をアクセプター基質、UDP-Gal をドナー基質としてコア 1 合成反応を行い HPLC にて解析した。

酵素源として、COS-1-pFLAG-CMV3-C1 Gal-T3 トランスフェクタント培養上清より FLAG tag で精製した C1 Gal-T3、Core 1 合成活性を有する細胞株 LSB の細胞抽出液（ポジティブコントロール）、Core 1 合成活性をもたない細胞株 LSC の細胞抽出液（ネガティブコントロール）を用いた結果を図 17 に示した。受容体として、蛍光標識した GalNAc-Ser を用いた。

また、酵素源として、すべて COS-1-pFLAG-CMV3-C1 Gal-T3 トランスフェクタント培養上清より FLAG tag で精製した C1 Gal-T3 を用いた結果を図 18 に示した。

#### 〔実施例 19〕 C1 Gal-T1、2、3 の基質特異性の比較

C1 Gal-T1、2、3 の基質特異性の比較を行った。LSC-C1 Gal-T1、LSC-C1 Gal-T2 のマイクロゾーム画分、COS-1-C1 Gal-T3 由来の精製酵素を酵素源として、各アクセプター基質に対するコア 1 合成活性を解析した（図 18）。

#### 〔実施例 20〕 C1 Gal-T1、2、3 の共発現

C1 Gal-T1、2、3 を下記に示す組み合わせで 293T 細胞に共発現させた。

- |    |                       |                   |
|----|-----------------------|-------------------|
| 1  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCDNAIHN          |
| 2  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCDNAIHN-C1Gal-T1 |
| 3  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCDNAIHN-C1Gal-T2 |
| 4  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCDNAIHN-C1Gal-T3 |
| 5  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCLN              |
| 6  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCLN-C1Gal-T1     |
| 7  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCLN-C1Gal-T2     |
| 8  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T1 + | pCLN-C1Gal-T3     |
| 9  | pFLAG-CMV3-C1Gal-T2 + | pCLN              |
| 10 | pFLAG-CMV3-C1Gal-T2 + | pCLN-C1Gal-T1     |
| 11 | pFLAG-CMV3-C1Gal-T3 + | pCLN              |
| 12 | pFLAG-CMV3-C1Gal-T3 + | pCLN-C1Gal-T1     |

培養上清および細胞より精製した C1 Gal-T1、2、3 の x1,000 anti-FLAG 抗体でウェスタンブロットを行い、共発現を解析した（図 19）。

さらに、C1 Gal-T1、2、3 の共発現 293T トランスフェクタントを用いたコア 1 合成活性の解析を行った。各 293T トランスフェクタントの培養上清より精製した C1 Gal-T を酵素源に、GalNAc-peptide に対するコア 1 合成活性を HPLC にて解析した（図 20）。アクセプター基質は、ある GalNAc に結合する IgA ヒンジペプチドである。

#### 〔実施例 21〕 C1 Gal-T2 病態モデルマウスの調製

以下の手順でノックアウトマウスを得た。まず、マウスの C1 Gal-T2 の ORF 全長を含む約 10 kb の染色体断片を挿入した直鎖状ターゲティングベクター 80 μg を、ES 細胞（E14 / 129Sv マウス由来）にトランスフェクション（エレクトロポ

レーション) し、G418 耐性のコロニーを選択した。G418 耐性コロニーを 24 ウェルプレートに移し、培養を行った。細胞の一部を凍結保存した後、残りの ES 細胞から DNA を抽出し、PCR により組み換えが起こっているクローンを 120 コロニー程度選択した。さらに、サザンブロッティングにより組み換えが予定通り起きていることを確認し、最終的に組み換え体を 10 クローン程度選択した。選択したうちの 2 クローンの ES 細胞を、C57BL/6 マウスの胚盤胞内に注入した。ES 細胞を注入したマウス胚を、仮親マウスの子宮内へ移植してキメラマウスを誕生させた。その後、ジャームトランスミッションによりヘテロノックアウトマウスを得た。

C1 Gal-T3 に関しては、現在のところマウスホモログが確認されていないが、ヒト由来細胞における siRNA 法によるノックダウン、あるいはトランスジェニック動物を得ることは可能である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規ガラクトース転移酵素をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法が提供された。さらに、該ポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物の同定方法が提供された。本発明のポリペプチドやポリヌクレオチド、または本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物は、本発明のポリペプチドが関連する疾患の新しい予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。さらに本発明によって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異や発現を検出することを含む疾患の検査方法が提供された。ガラクトース転移酵素は医薬品開発や医療の分野において最も重要かつ注目されている分子の一つであり、本発明において新規ガラクトース転移酵素が提供されたことにより、これら分野の発展が期待される。ガラクトース転移酵素の研究者にとっても、本発明は



貴重な情報源となり得るものと期待される。

## 請求の範囲

1. 下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチド。
  - (a) 配列番号：2 または 19 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
  - (b) 配列番号：1 または 18 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド
2. ガラクトース転移活性を有する、下記 (c) または (d) に記載のポリヌクレオチド。
  - (c) 配列番号：2 または 19 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
  - (d) 配列番号：1 または 18 に記載の塩基配列からなる DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド
3. 配列番号：2 または 19 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチド。
4. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
5. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載のベクターを保持する宿主細胞。
6. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。
7. 請求項 5 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、請求項 6 に記載のポリペプチドの製造方法。
8. 請求項 6 に記載のポリペプチドに結合する抗体。
9. 請求項 6 に記載のポリペプチドの活性または発現を増加させる必要がある

患者を治療するための医薬組成物であって、下記（a）から（c）に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

（a）請求項1から3のいずれかに記載のポリヌクレオチド

（b）請求項4に記載のベクター

（c）請求項6に記載のポリペプチド

10. 請求項6に記載のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記（a）または（b）に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

（a）請求項8に記載の抗体

（b）生体内において、内因性の請求項6に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチド

11. 請求項6に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項6に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニング方法であって、

（a）被験化合物と請求項6に記載のポリペプチドとを接触させる工程、

（b）請求項6に記載のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を測定する工程、

（c）被験化合物を接触させない場合と比較して、ガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物を選択する工程、を含む方法。

12. 請求項6に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項6に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子またはその発現制御領域の変異を検出することを含む方法。

13. 以下の（a）～（d）の工程を含む、請求項12に記載の検査方法。

（a）被検者からDNA試料を調製する工程

（b）請求項6に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域

を単離する工程

(c) 単離した DNA の塩基配列を決定する工程

(d) 工程 (c) により決定した DNA の塩基配列を、対照と比較する工程。

1 4. 以下の (a) ~ (d) の工程を含む、請求項 1 2 に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 調製した DNA 試料を制限酵素により切断する工程

(c) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

(d) 検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

1 5. 以下の (a) ~ (e) の工程を含む、請求項 1 2 に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 請求項 6 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を制限酵素により切断する工程

(d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

(e) 検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

1 6. 以下の (a) ~ (e) の工程を含む、請求項 1 2 に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 請求項 6 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程

(d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程

(e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

1 7. 以下の (a) ~ (d) の工程を含む、請求項 1 2 に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 請求項 6 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程

(d) 分離した DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

18. 請求項6に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子の発現量を検出することを含む方法。

19. 以下の(a)～(c)の工程を含む、請求項18に記載の検査方法。

(a) 被検者から RNA 試料を調製する工程

(b) 該 RNA 試料に含まれる請求項6に記載のポリペプチドをコードする RNA の量を測定する工程

(c) 測定された RNA の量を対照と比較する工程

20. 以下の(a)～(d)の工程を含む、請求項18に記載の検査方法。

(a) 被検者から調製した cDNA 試料、および請求項5に記載のポリペプチドをコードする DNA とハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程

(b) 該 cDNA 試料と該基板を接触させる工程

(c) 該 cDNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該 cDNA 試料に含まれる請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する工程

(d) 測定された請求項6に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する工程

21. 以下の(a)～(c)の工程を含む、請求項18に記載の検査方法。

(a) 被検者からタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる請求項6に記載のポリペプチドの量を測定する工程

(c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程

22. 疾患が IgA 腎症または Tn 症候群である、請求項12～21のいずれか

に記載の検査方法。

23. 請求項6に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド。

24. 請求項23に記載のオリゴヌクレオチドを含む、請求項6に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項6に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。

25. 請求項8に記載の抗体を含む、請求項6に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項6に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。

26. 疾患がIgA腎症またはTn症候群である、請求項24または25に記載の検査薬。

27. ClGal-T2 タンパク質の発現が人為的に改変された遺伝子改変非ヒト動物。

28. ClGal-T2 タンパク質をコードする外来ポリヌクレオチドが導入された遺伝子改変非ヒト動物。

29. 非ヒト動物がマウスである、請求項27または28に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

30. 請求項27～29のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物から樹立された細胞。

31. 以下の(a)～(c)の工程を含む、ClGal-T2 タンパク質の活性を変化させる化合物のスクリーニング方法。

(a) 請求項27～29のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物に被検化合物を投与する、または、請求項30に記載の細胞と被検化合物を接触させる工程

(b) 前記遺伝子改変動物もしくは細胞における ClGal-T2 タンパク質の活性もしくは発現量を測定する工程

(c) 被検化合物を投与していない場合と比較して、ClGal-T2 タンパク質の活性もしくは発現量を変化させる化合物を選択する工程

☒ 1

	AGAACAGCCTGGTCAGGAGCGTAACGGAGTGGTGCGCCAACGTG	-61
-60	AGAGGAAACCCGTGCGCGGCTGCGCTTTCCTGTCCCCAAGCCGTTCTAGACGCGGGAAAA	-1
1	ATGCTTTCTGAAAGCAGCTCCTTTTTGAAGGGTGTGATGCTTGGGAAGCATTTCCTGTGCT	60
	M L S E S S S F L K G V M L G S I F C A	
61	TTGATCACTATGCTAGGACACATTAGGATTGGTCATGGAAATAGAATGCACCACCATGAG	120
	L I T M L G H I R I G H G N R M H H H E	
121	CATCATCACCTACAAGCTCCTAACAAGAAGATATCTTGAAAATTCAGAGGATGAGCGC	180
	H H H L Q A P N K E D I L K I S E D E R	
181	ATGGAGCTCAGTAAGAGCTTTCAGTATACTGTATTATCCTTGTAACCCCAAAGATGTG	240
	M E L S K S F R V Y C I I L V K P K D V	
241	AGTCTTTGGGCTGCAGTAAAGGAGACTTGGACCAAACACTGTGACAAAGCAGAGTTCTTC	300
	S L W A A V K E T W T K H C D K A E F F	
301	AGTTCTGAAAATGTTAAAGTGTGTTGAGTCAATTAATATGGACACAAATGACATGTGGTTA	360
	S S E N V K V F E S I N M D T N D M W L	
361	ATGATGAGAAAAGCTTACAAATACGCCTTGTATAAGTATAGAGACCAATACAACCTGGTTC	420
	M M R K A Y K Y A F D K Y R D Q Y N W F	
421	TTCCTTGACGCCCCACTACGTTTGCTATCATTGAAAACCTAAAGTATTTTTTGTAAAA	480
	F L A R P T T F A I I E N L K Y F L L K	
481	AAGGATCCATCACAGCCTTCTATCTAGGCCACACTATAAAATCTGGAGACCTTGAATAT	540
	K D P S Q P F Y L G H T I K S G D L E Y	
541	GTGGGTATGGAAGGAGGAATTGTCTTAAGTGTAGAATCAATGAAAAGACTTAACAGCCTT	600
	V G M E G G I V L S V E S M K R L N S L	
601	CTCAATATCCCAGAAAAGTGTCTGAACAGGGAGGGATGATTTGGAAGATATCTGAAGAT	660
	L N I P E K C P E Q G G M I W K I S E D	
661	AAACAGCTAGCAGTTTGCCTGAAATATGCTGGAGTATTTGCAGAAAATGCAGAAGATGCT	720
	K Q L A V C L K Y A G V F A E N A E D A	
721	GATGGAAAAGATGTATTTAATACCAAATCTGTTGGGCTTTCTATTAAAGAGGCAATGACT	780
	D G K D V F N T K S V G L S I K E A M T	
781	TATCACCCCAACCAGGTAGTAGAAGGCTGTTGTTTCAGATATGGCTGTTACTTTTAATGGA	840
	Y H P N Q V V E G C C S D M A V T F N G	
841	CTGACTCCAAATCAGATGCATGTGATGATGATGTTGGGGTATACCGCCTTAGGGCATTGGG	900
	L T P N Q M H V M M Y G V Y R L R A F G	
901	CATATTTCAATGATGCATTGGTTTCTTACCTCCAAATGGTTCTGACAATGACTGAGAA	960
	H I F N D A L V F L P P N G S D N D *	
961	GTGGTAGAAAAGCGTGAATATGATCTTTGTATAGGACGTGTGTTGTCTATTATTTGTAGTA	1020
1021	GTAACACATATCCAATACAGCTGTATGTTTCTTTTCTTTTCTAATTGGTGGCACTGG	1080
1081	TATAACCACACATTAAAGTCAGTAGTACATTTTTAAATGAGGGTGGTTTTTTCTTTAAA	1140
1141	ACACATGAACATTGTAAATGTGTTGGAAAGAAGTGTTTTAAGATAATAATTTTGCAAAT	1200
1201	AAACTATTAAATAAATATTATATGTGATAAATTCTAAATTATGAACATTAGAAATCTGTGG	1260
1261	GGCACATATTTTGTCTGATTGGTTAAAAAATTTAACAGGTCTTTAGCGTTCTAAGATAT	1320
1321	GCAAAATGATATCTCTAGTTGTGAATTTGTGATTAAAGTAAAACCTTT	



図 2

C1Gal-T1	MASKSWLNFLTFLCGSAIGFLLSOLFSSILLGEKVDTPQPNVLHNDPHARHSDDNGQNHLE
C1Gal-T2	MLSES----SSFLKGVMLGSIFCALIT--MLGHIRIGHGNRMHHHEHHHLQAPNK----E
	* * * * * * * * * *
C1Gal-T1	GQMFNADSSQHKDENTDIAENLYQKVRILCWMTGPQNLEKKAKHV KATWAQRONKVL F
C1Gal-T2	DILKISED-----E-R--ME-LSKSFRVYCHILVKPKDVSLWAA-VKETWTKHCKA E F
	* * * * * * * * * *
C1Gal-T1	MSSEENKDFPAVGLKTKEGRDQLYWKTIKAFQYVHEHYLEDADWFLKADDDTYVILDNLR
C1Gal-T2	FSSENVKVFESINMDTN---DMWLMMRKAYKYAFDKYRDQYNWFFLARPTTFAI IENLK
	*** * * * * * * * * *
C1Gal-T1	WLLSKYDPEEPIYFGRRFKPYVKQGYMSGGAGYVLSKEALKRFVDAFKT-DKCTHSS---
C1Gal-T2	YFLLKKDPSQPFYLGHTIK-SGDLEYVMEGGIVLSVESMKRLNSLLNIPEKCP EQGGMI
	* * * * * * * * * *
C1Gal-T1	--SIEDLALGRMEIMNVEAGDSRDTIGKETFHPFVPEHHLIKGYLPRTFWYWNYYPP
C1Gal-T2	WKISEDKQLAVCLKYAGVFAENAEDADGKDVFN TKSVGLS I KEAMT-----YHPN
	* * * * * * * * * *
C1Gal-T1	VEGPGCCSDLAVSFHYVDSTTMYELEYLVYHLRPYGYLYRYQPTLPERILKEISQANKNE
C1Gal-T2	QVVEGCCSDMAVTFNGLTPNQMHVMMYGVYRLRAFGHIFNDALVFLP-----P-NGSDND
	***** * * * * * * * *
C1Gal-T1	DTKVKLGNP
C1Gal-T2	-----

3 / 2 1

☒ 3

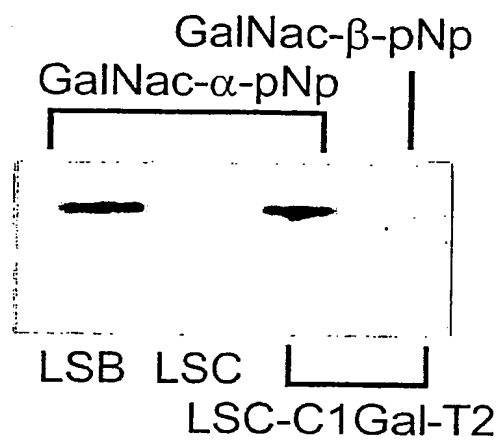


図 4

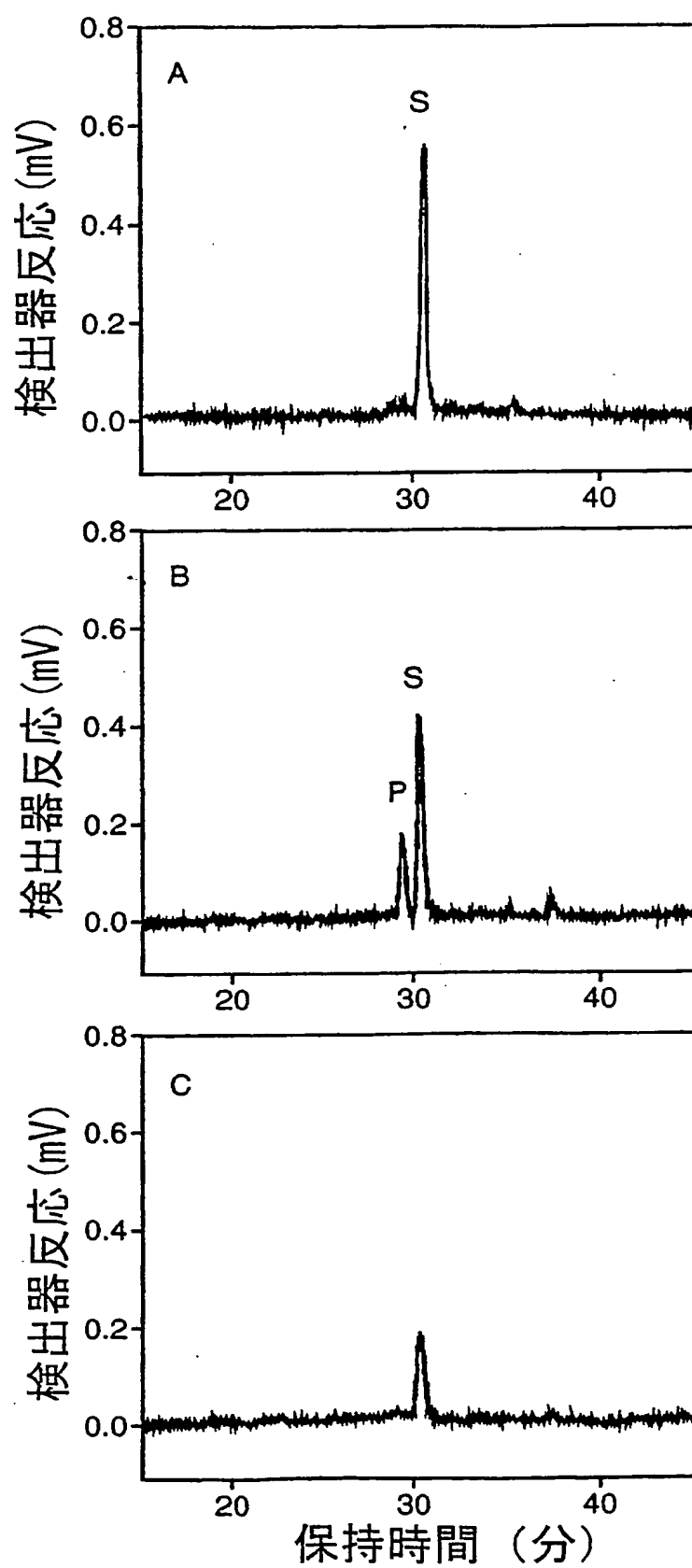


図 5

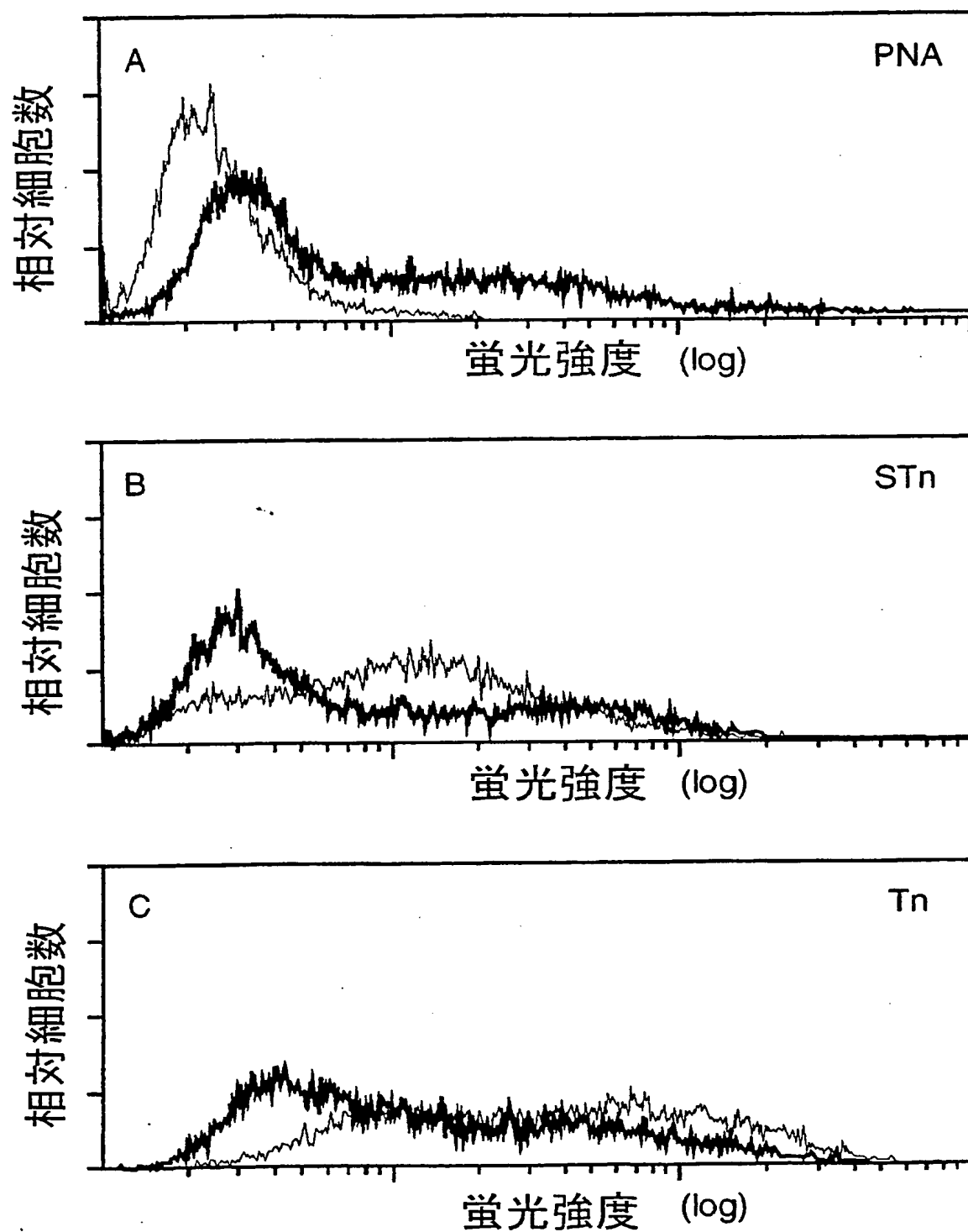


図 6

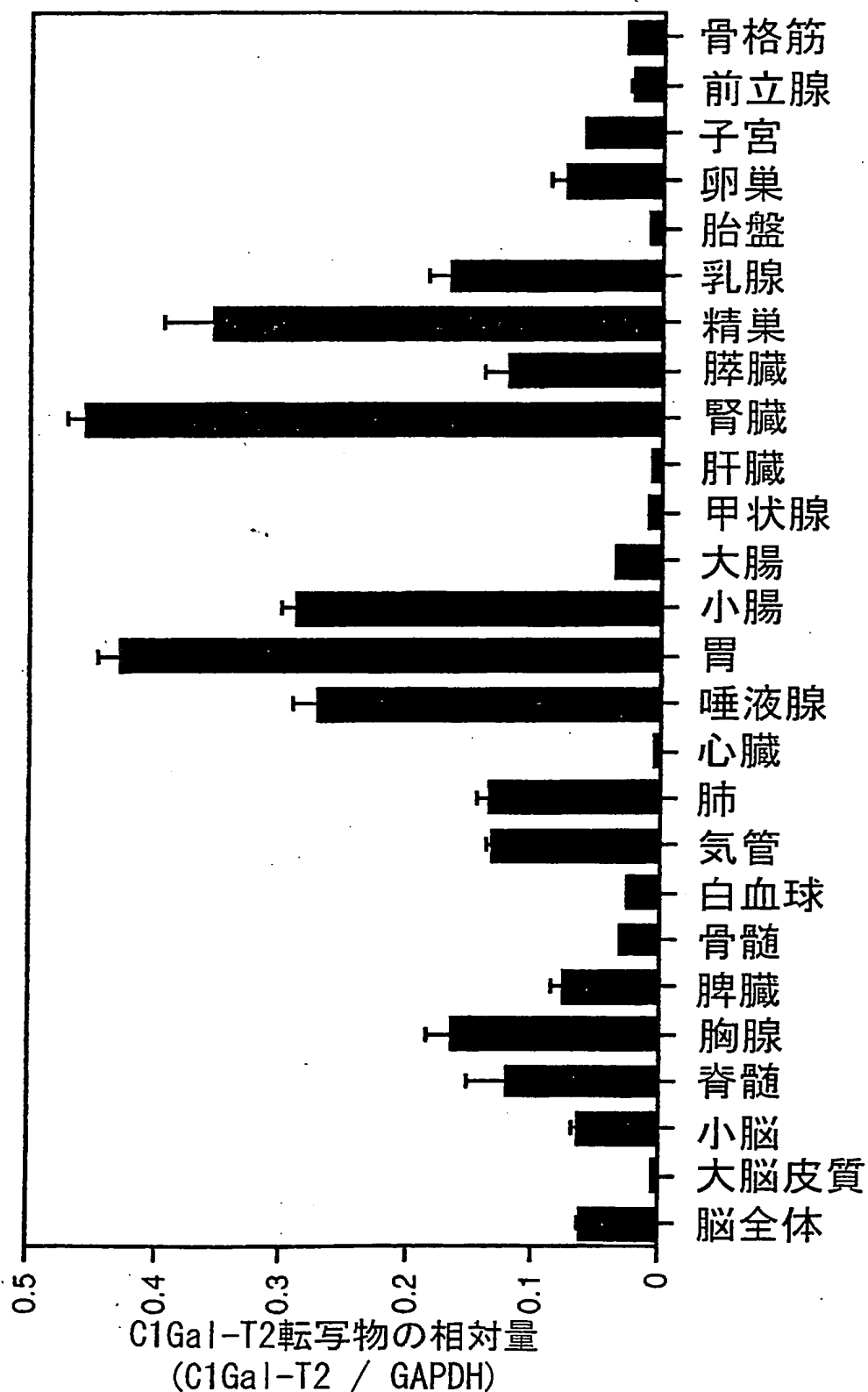
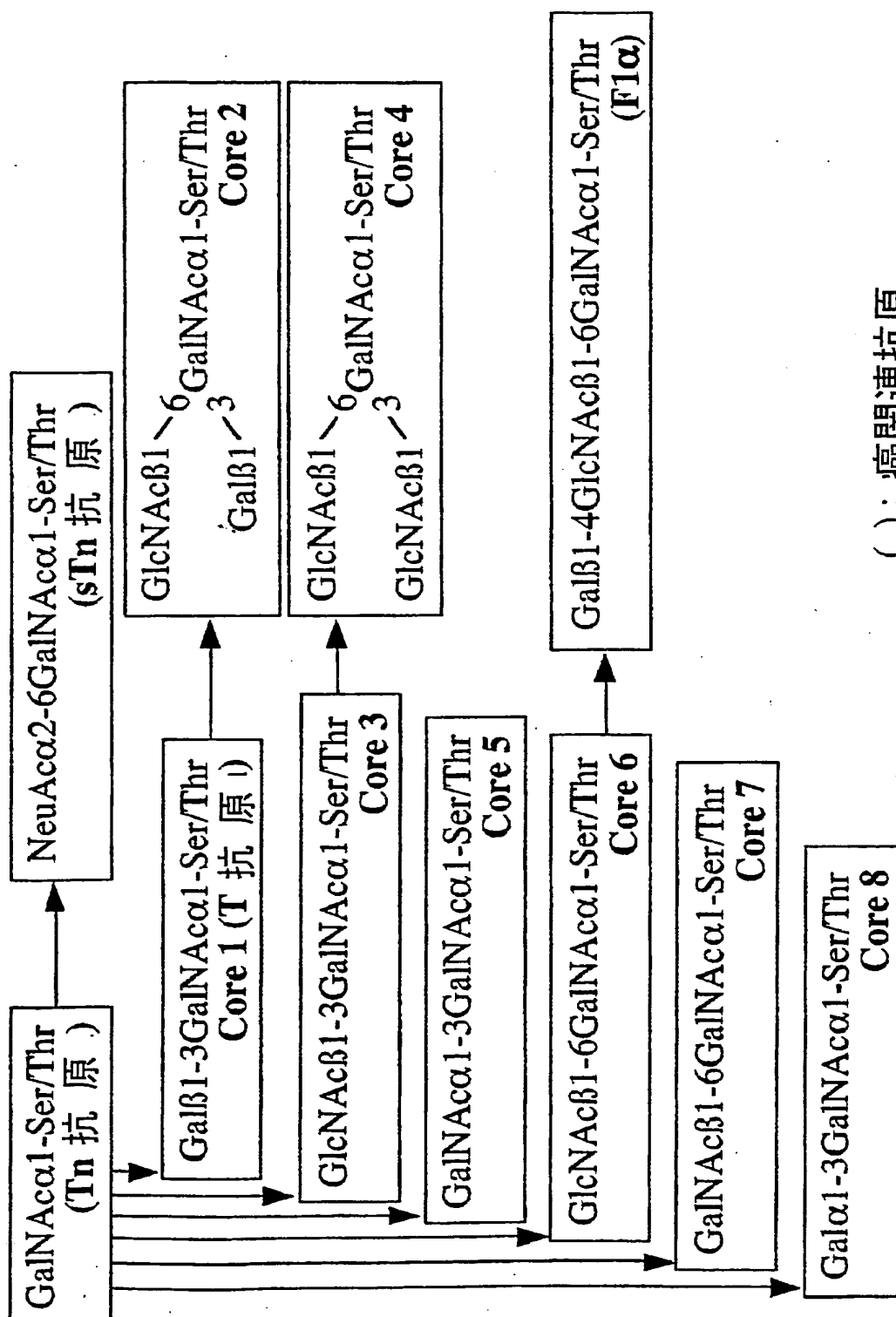


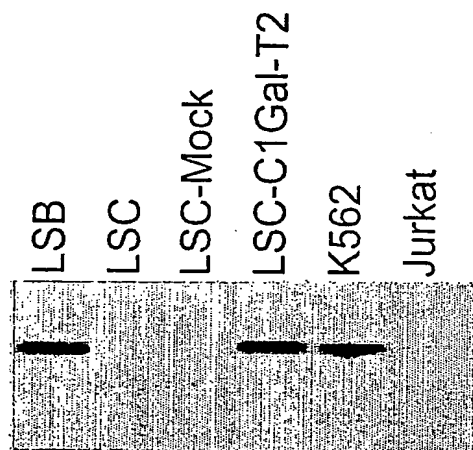
図 7



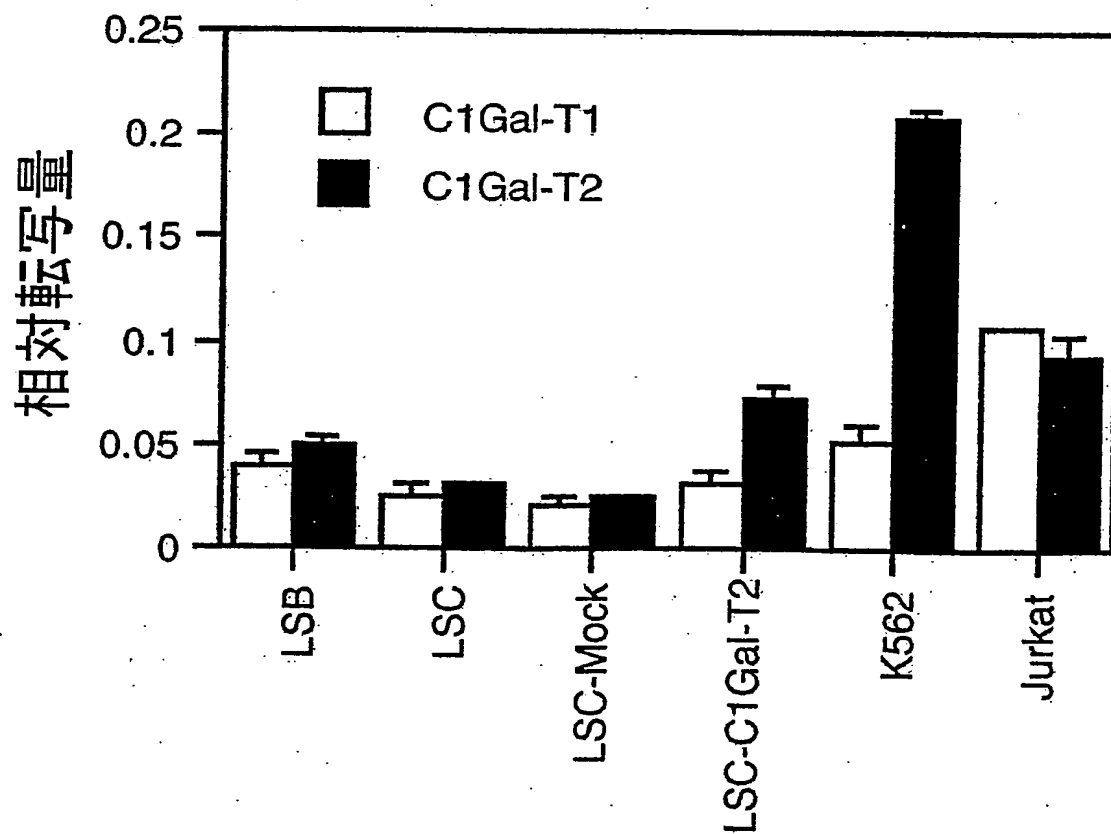
( ): 癌関連抗原

図 8

A



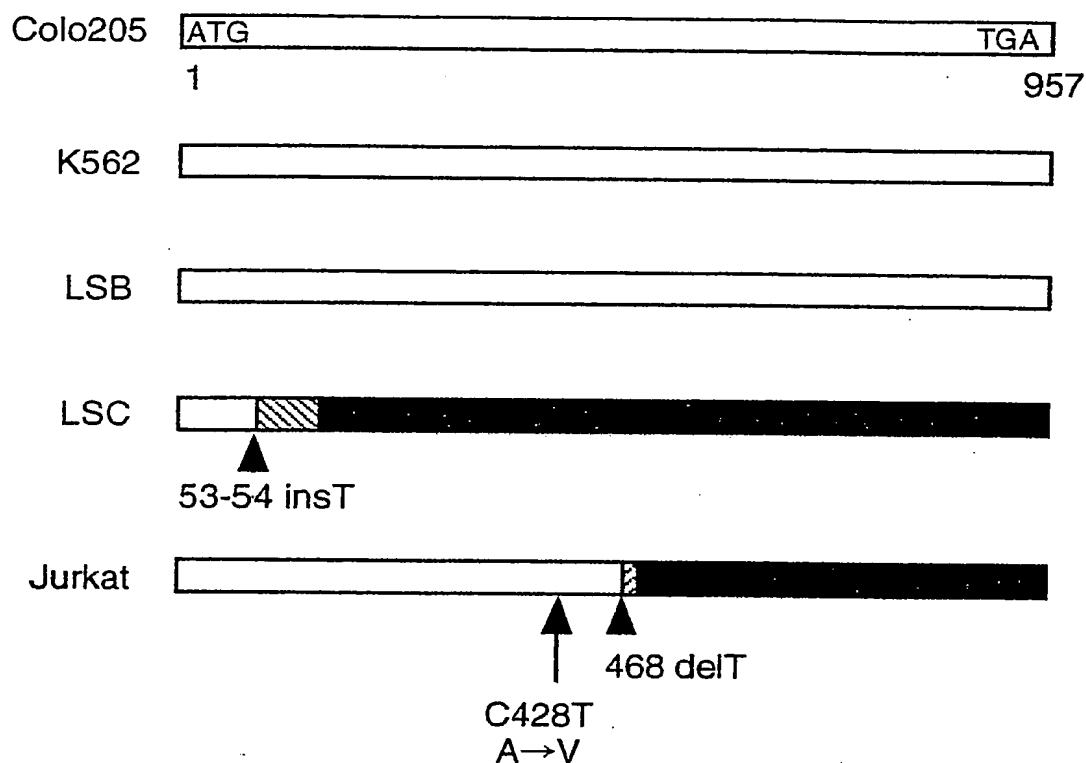
B



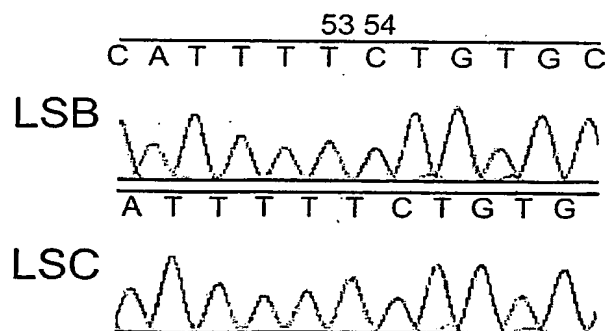
9

A

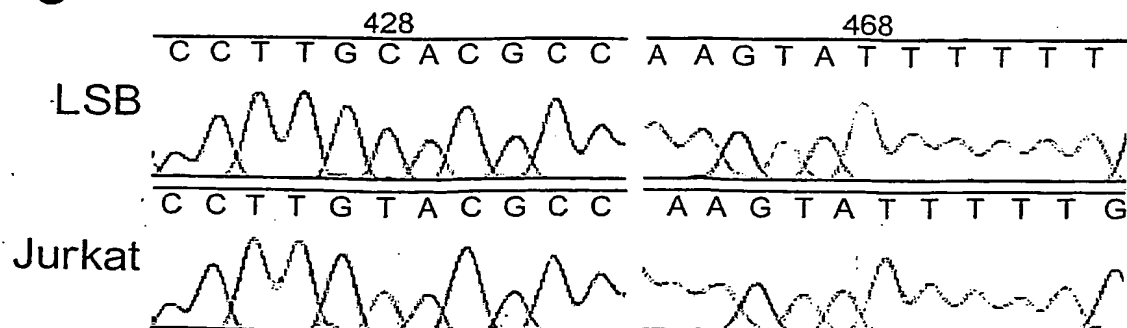
## C1Gal-T2



B



C





☒ 10

C1Gal-T3	1'	MVSASGTSFFKGMLLGSISWVLITMFGQIHHRGQTQDHEHHHLRPPNRNDFLNTSKVI
C1Gal-T2	1"	MLSESSSFLKGVMLGSIFCALITMLGHIRIGHGNRMHHHEHHHLQAPNKEDILKISEDE
		**** * * * * * * * * * *
C1Gal-T3	61'	LLELSKSIRVFCIIFGESEDESYWAVLKETWTKHCDAELYDTKNDNLF---NIESNDRW
C1Gal-T2	60"	RMELSKSFRVYCIILVKPKDVSLWAAVKETWTKHCDAEFFSSENVKVFESINMDTNDMW
		***** * * * * * * * * * * * * * * *
C1Gal-T3	118'	VQMR TAYKYVFEKYGDYNWFFLALPTTFAVIENLKYLLETRDASQPFYLGHTVIFGDLE
C1Gal-T2	120"	LMMRKAYKYAFDKYRDQYNWFFLARPTTFAI IENLKYLFLKKDPSQPFYLGHTIKSGDLE
		* *
C1Gal-T3	178'	YVTVEGGIVLSRELMKRLNRLLDNSETCADQ-SVIWKLSEDKQLAICLKYAGVHAENAED
C1Gal-T2	180"	YVGMEGGIVLSVESMKRLNSLLNIPEKCP EQGGM IWKISEDKQLAVCLKYAGVFAENAED
		* *
C1Gal-T3	237'	YEGRDVFNTKPIAQLIEEALSNNPQQVVEGCCSDMAITFNGLTPQKMEVMMYGLYRLRAF
C1Gal-T2	240"	ADGKDVFNTKSVGLSIKEAMTYHPNQVVEGCCSDMAVTFNGLTPNQMHVMMYGVYRLRAF
		* *
C1Gal-T3	297'	GHYFN DTLVFLPPVGSEND
C1Gal-T2	300"	GHIFNDALVFLPPNGSDND
		* * * * * * * * * *

図 11

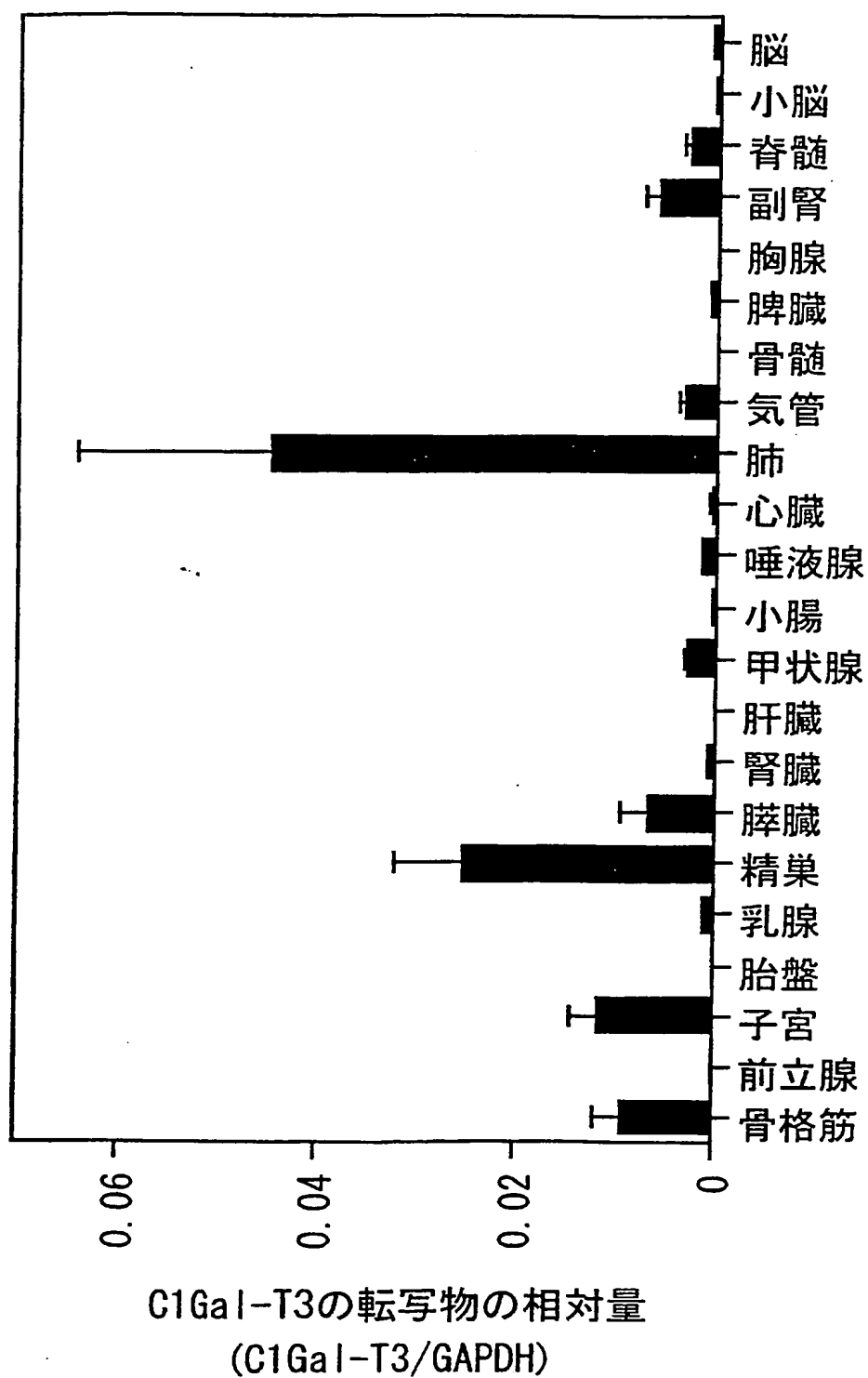


図12

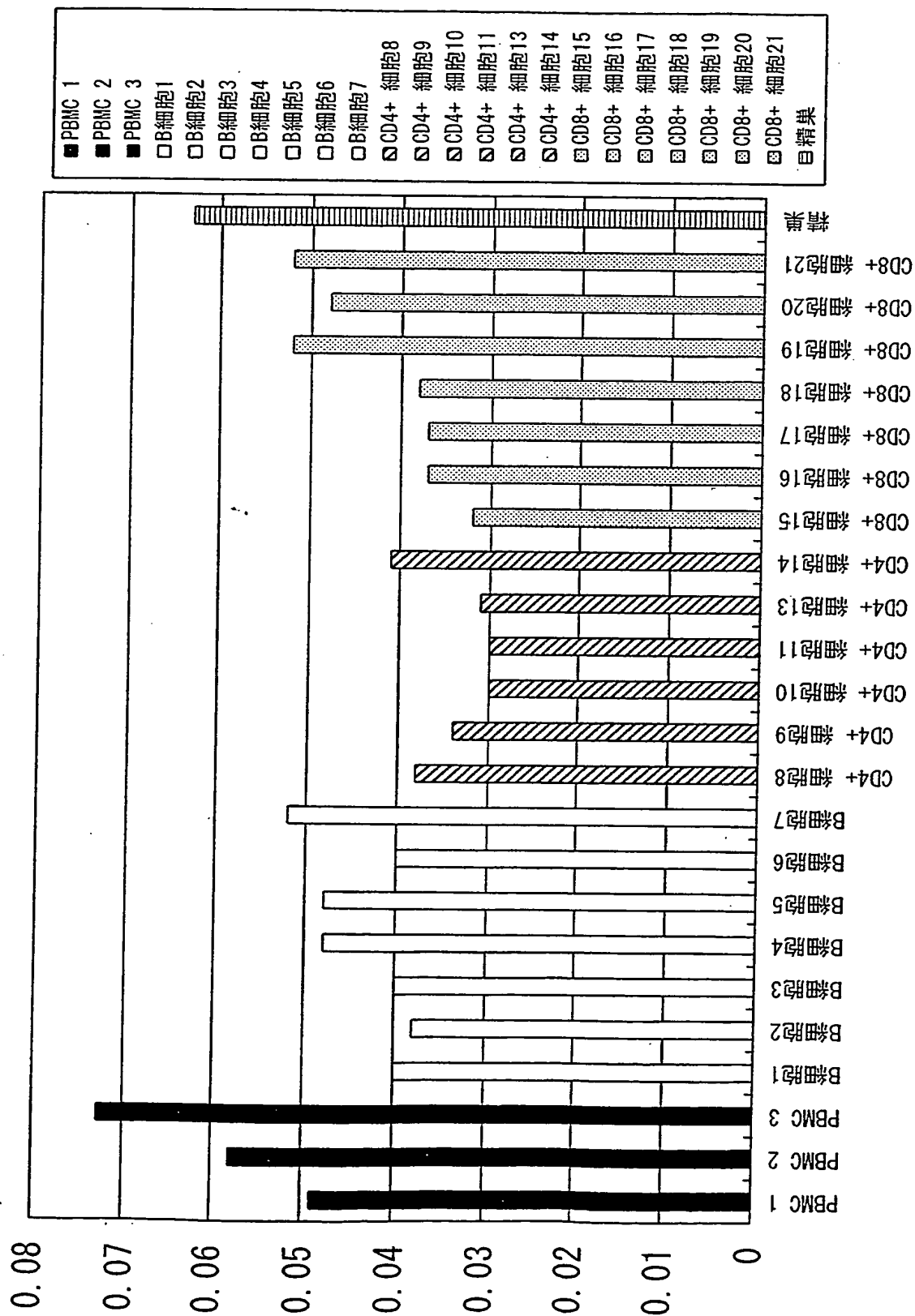


図13

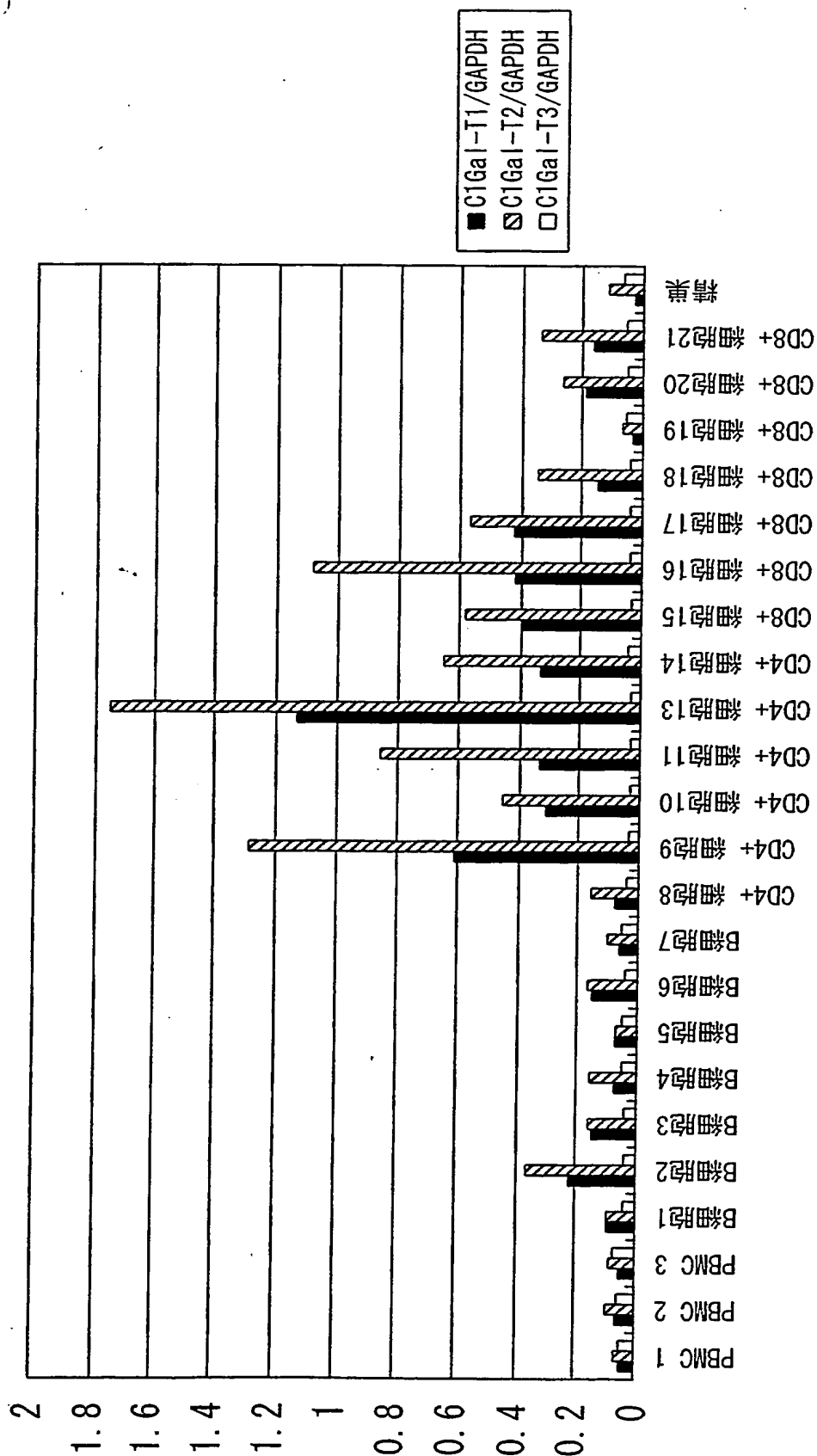
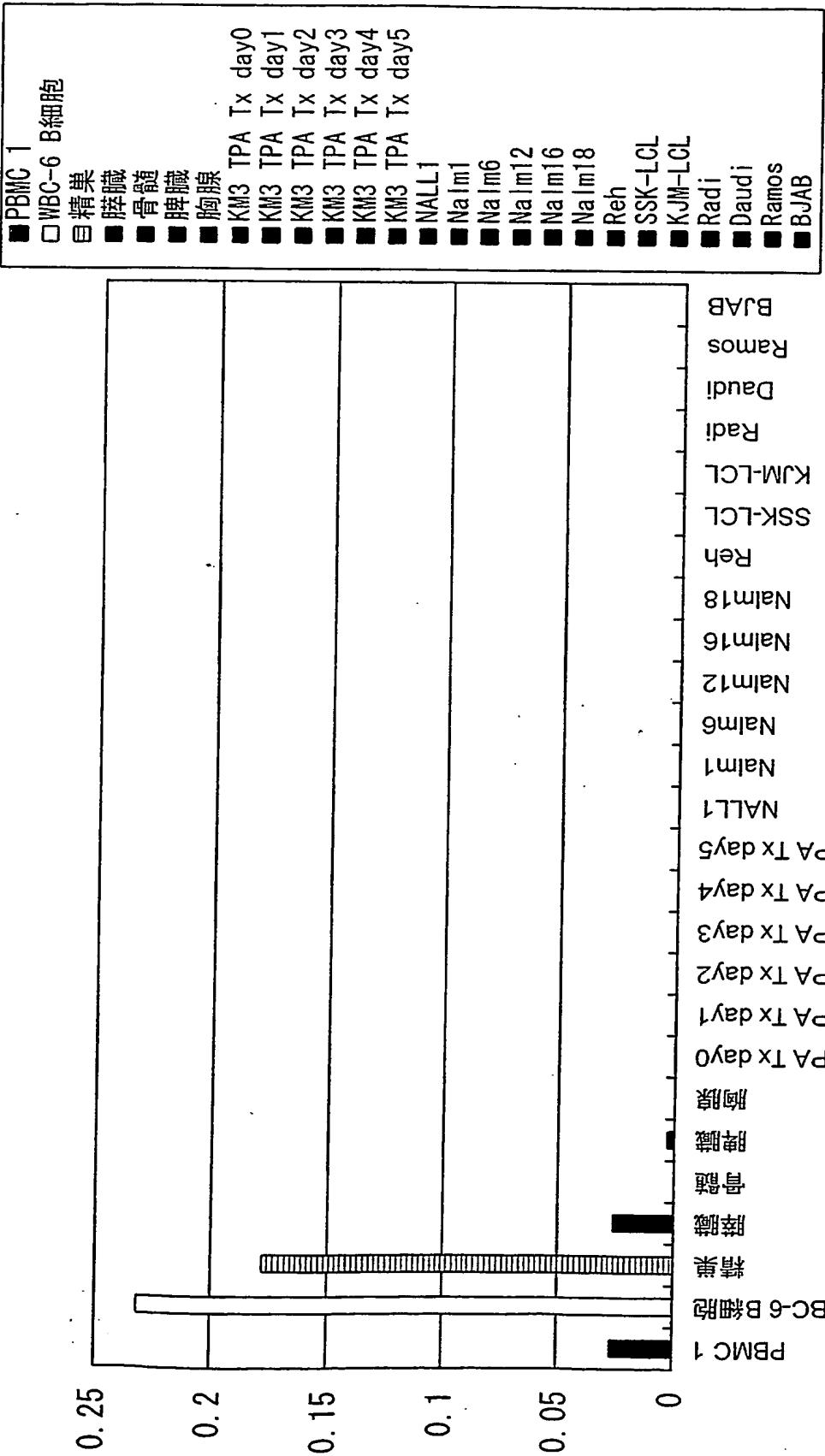


図 14



15 / 21

10/509785

図 15

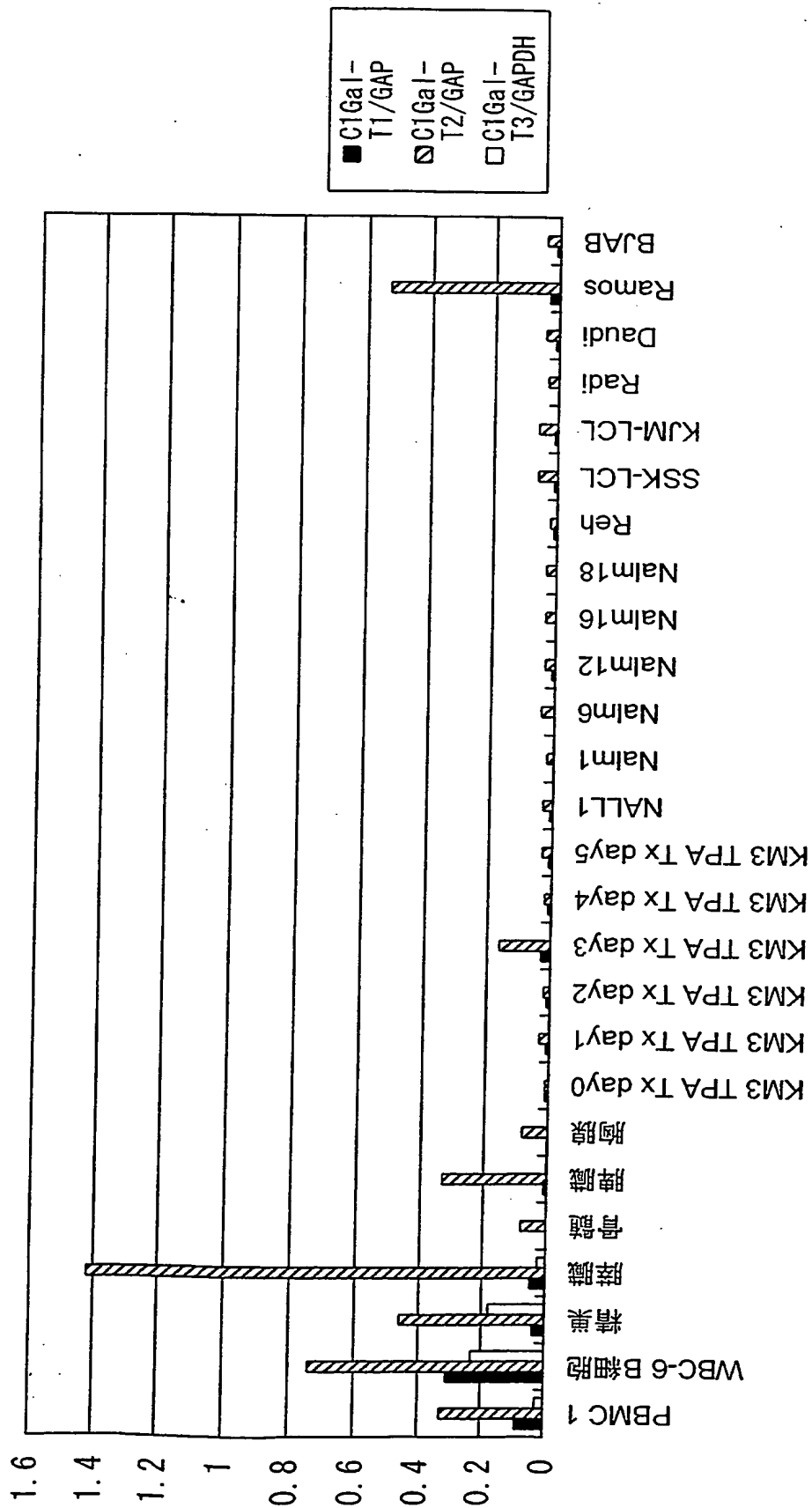
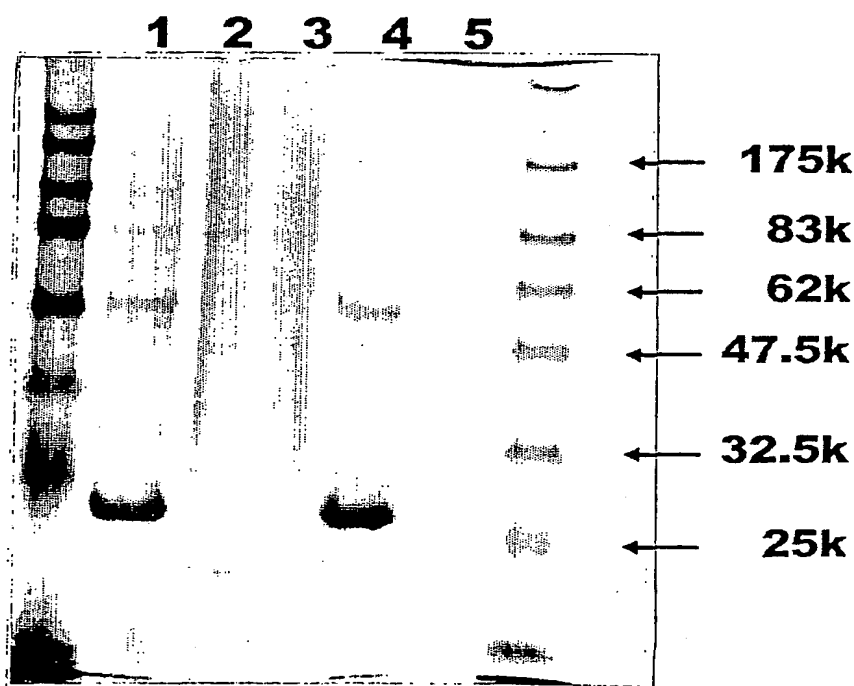
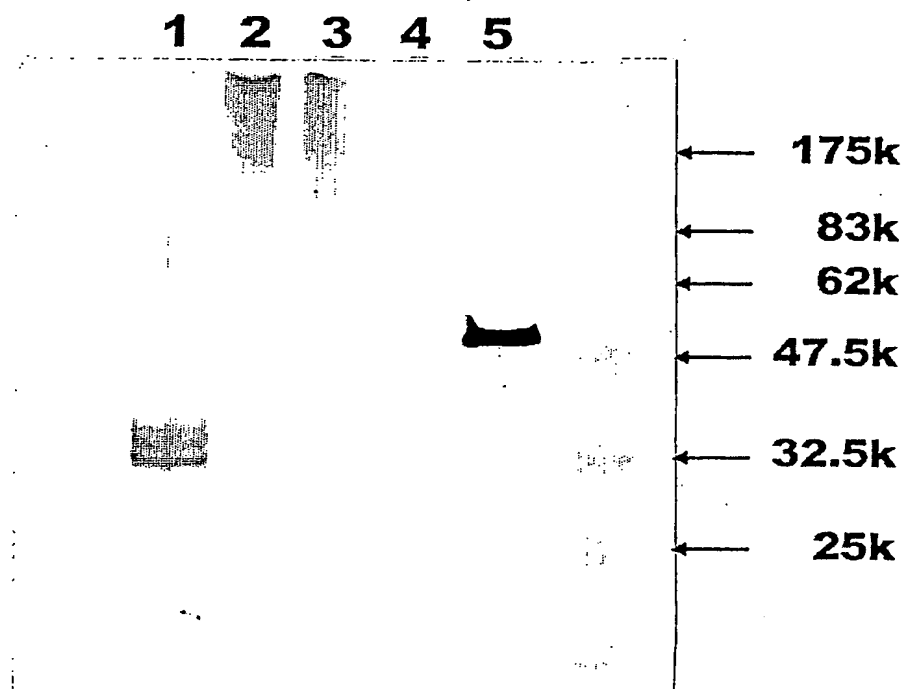


図 16



2ME      boil

- |                    |   |   |
|--------------------|---|---|
| 1 COS1-C1Gal-T3    | + | + |
| 2 COS1-C1Gal-T3    | - | - |
| 3 COS1-C1Gal-T3    | - | + |
| 4 M1 アガロース (N.C.)  | + | + |
| 5 BAP 100ng (P.C.) |   |   |

17

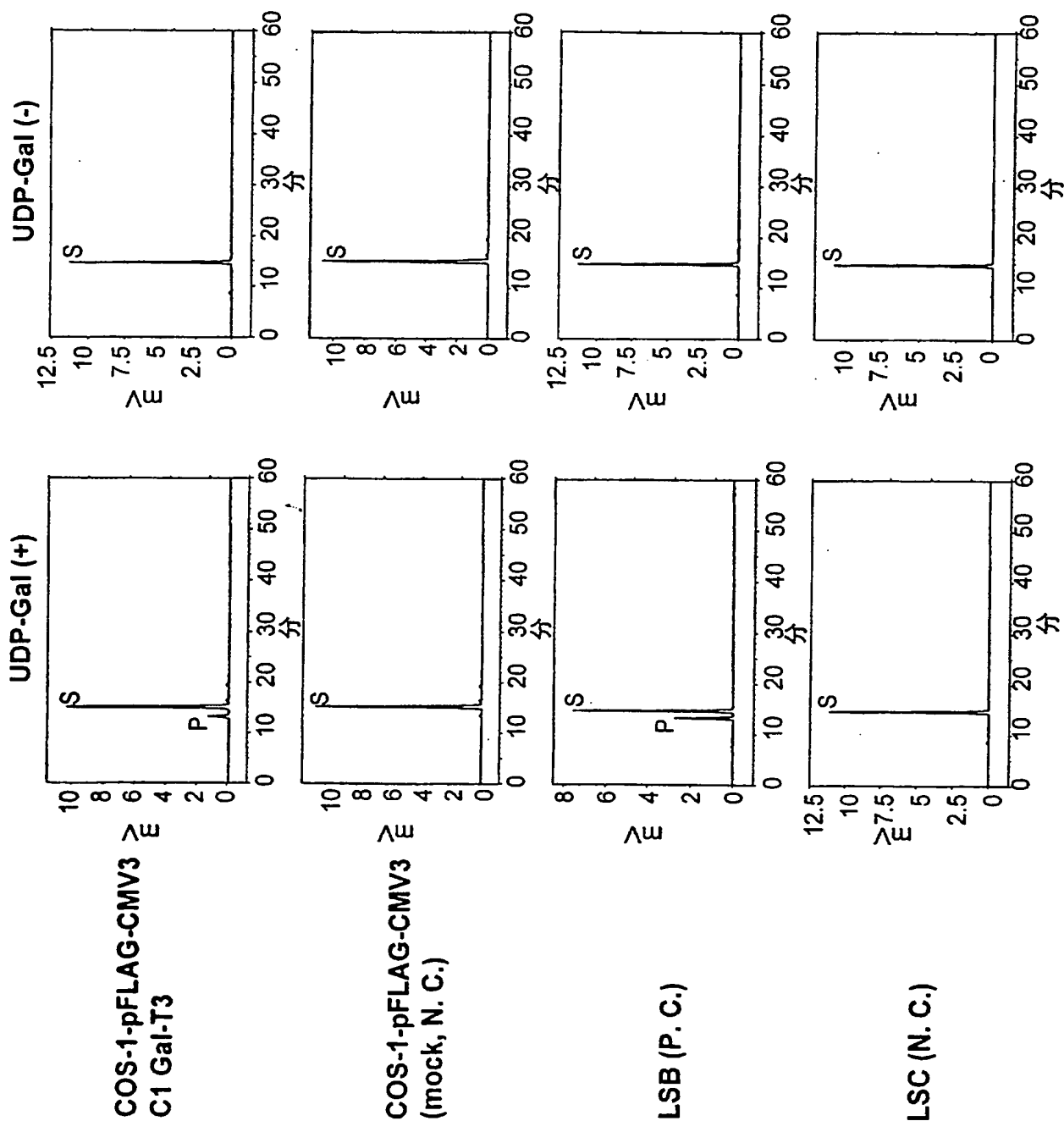




図 18

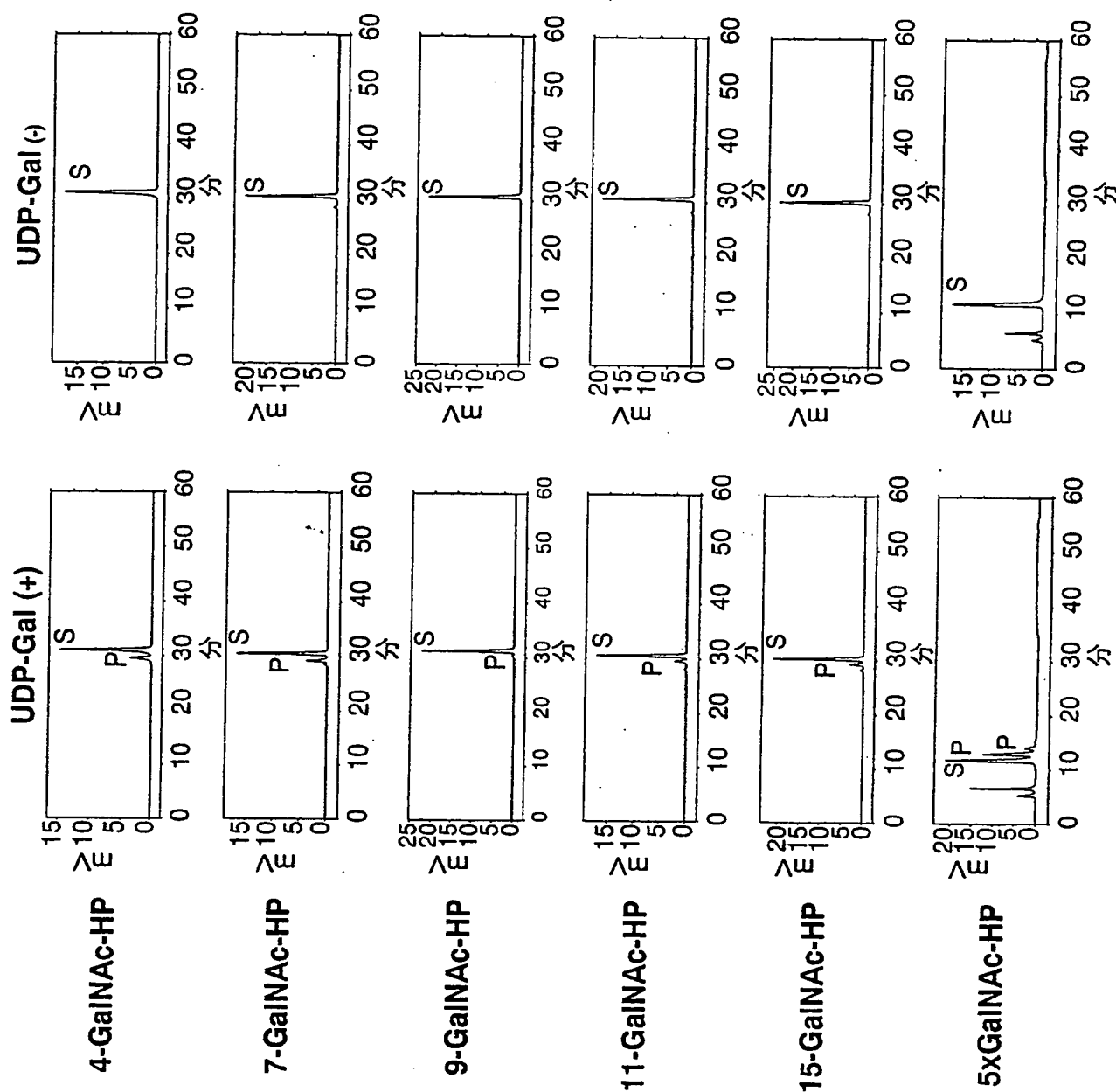
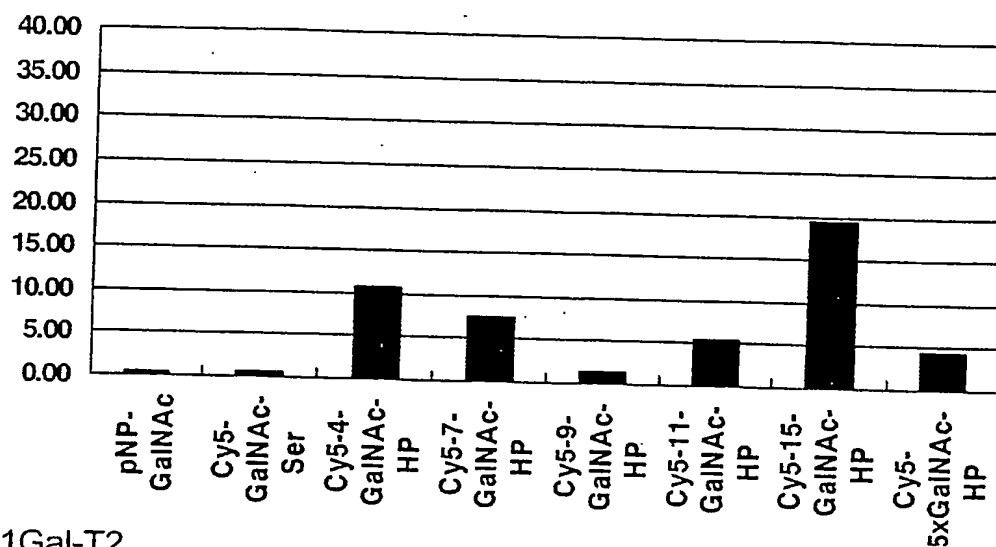
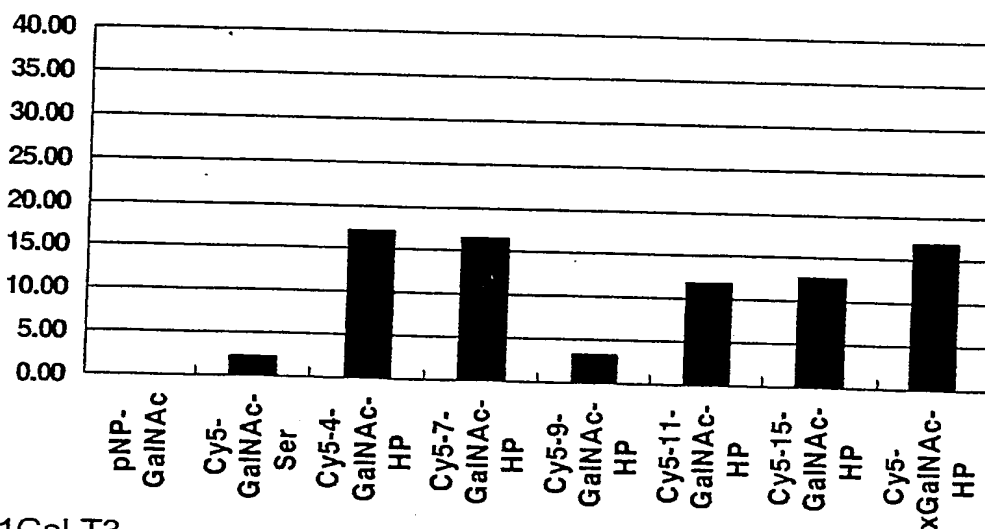


图 19

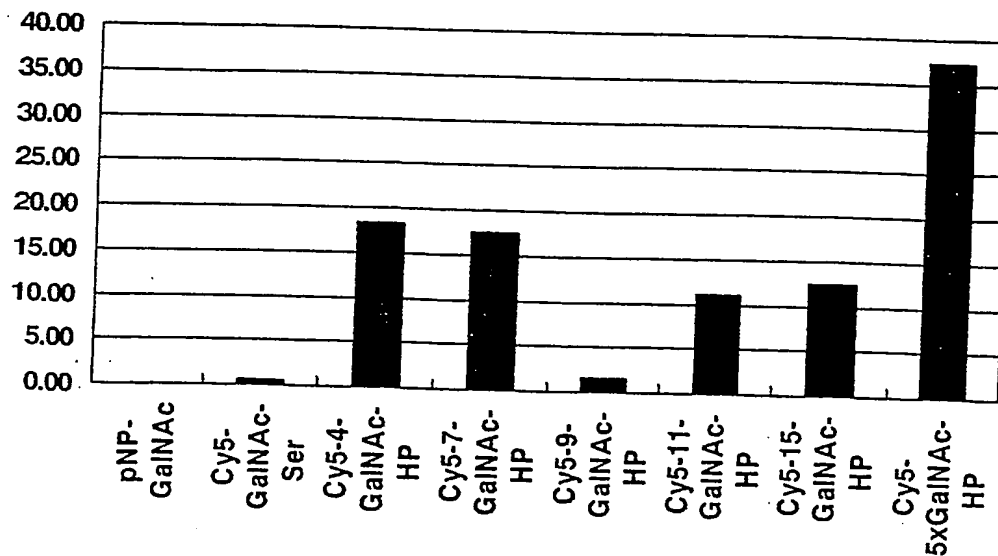
C1Gal-T1



C1Gal-T2



C1Gal-T3



20/21

10/509785

図 20

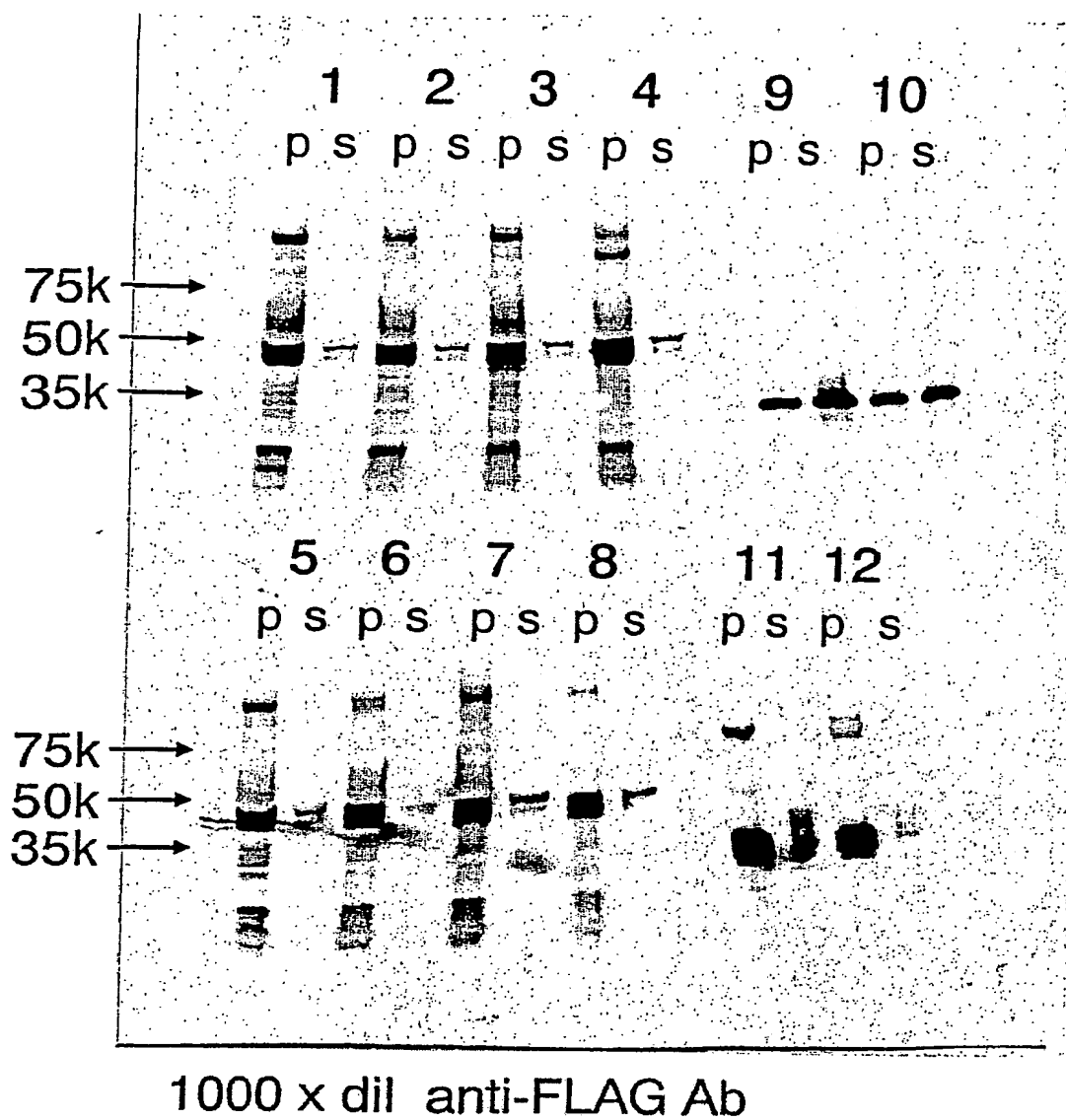


図 2 1

## 基質ピーク産物ピーク

1	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCDNAIHN	—	+++
2	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCDNAIHN-C1Gal-T1	—	+++
3	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCDNAIHN-C1Gal-T2	—	+++
4	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCDNAIHN-C1Gal-T3	—	+++
5	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCLN	—	+++
6	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCLN-C1Gal-T1	—	+++
7	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCLN-C1Gal-T2	—	+++
8	pFLAG-CMV3-C1Gal-T1	+	pCLN-C1Gal-T3	—	+++
9	pFLAG-CMV3-C1Gal-T2	+	pCLN	++	++
10	pFLAG-CMV3-C1Gal-T2	+	pCLN-C1Gal-T1	—	+++
11	pFLAG-CMV3-C1Gal-T3	+	pCLN	+++	—
12	pFLAG-CMV3-C1Gal-T3	+	pCLN-C1Gal-T1	±	+++

1 / 2 4

10/509785  
DT04 Rec'd PCT/PTO 29 SEP 2004

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Novel galactosyltransferase, the polypeptide of the enzyme,  
and the nucleic acid encoding the enzyme

<130> A3-A0201Y1P

<140>

<141>

<150> JP 2002-94772

<151> 2002-03-29

<150> JP 2002-201344

<151> 2002-07-10

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1471

<212> DNA

<213> Homo sapiens

2 / 24

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (105)..(1058)

&lt;400&gt; 1

agaacagcct ggcaggagc gtaacggagt ggtagcgcaa cgtgagagga aaccctgctg 60

cggctgctgt ttcctgtccc caagccgttc tagacgcggg aaaa atg ctt tct gaa 116

Met Leu Ser Glu

1

agc agc tcc ttt ttg aag ggt gtg atg ctt gga agc att ttc tgt gct 164

Ser Ser Ser Phe Leu Lys Gly Val Met Leu Gly Ser Ile Phe Cys Ala

5

10

15

20

ttg atc act atg cta gga cac att agg att ggt cat gga aat aga atg 212

Leu Ile Thr Met Leu Gly His Ile Arg Ile Gly His Gly Asn Arg Met

25

30

35

cac cac cat gag cat cat cac cta caa gct cct aac aaa gaa gat atc 260

His His His Glu His His His Leu Gln Ala Pro Asn Lys Glu Asp Ile

40

45

50

ttg aaa att tca gag gat gag cgc atg gag ctc agt aag agc ttt cga 308

Leu Lys Ile Ser Glu Asp Glu Arg Met Glu Leu Ser Lys Ser Phe Arg

3 / 2 4

55

60

65

gta tac tgt att atc ctt gta aaa ccc aaa gat gtg agt ctt tgg gct 356

Val Tyr Cys Ile Ile Leu Val Lys Pro Lys Asp Val Ser Leu Trp Ala

70

75

80

gca gta aag gag act tgg acc aaa cac tgt gac aaa gca gag ttc ttc 404

Ala Val Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp Lys Ala Glu Phe Phe

85

90

95

100

agt tct gaa aat gtt aaa gtg ttt gag tca att aat atg gac aca aat 452

Ser Ser Glu Asn Val Lys Val Phe Glu Ser Ile Asn Met Asp Thr Asn

105

110

115

gac atg tgg tta atg atg aga aaa gct tac aaa tac gcc ttt gat aag 500

Asp Met Trp Leu Met Met Arg Lys Ala Tyr Lys Tyr Ala Phe Asp Lys

120

125

130

tat aga gac caa tac aac tgg ttc ttc ctt gca cgc ccc act acg ttt 548

Tyr Arg Asp Gln Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Arg Pro Thr Thr Phe

135

140

145

gct atc att gaa aac cta aag tat ttt ttg tta aaa aag gat cca tca 596

Ala Ile Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Phe Leu Leu Lys Lys Asp Pro Ser

150

155

160

4 / 24

cag cct ttc tat cta ggc cac act ata aaa tct gga gac ctt gaa tat 644

Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Ile Lys Ser Gly Asp Leu Glu Tyr

165 170 175 180

gtg ggt atg gaa gga gga att gtc tta agt gta gaa tca atg aaa aga 692

Val Gly Met Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Val Glu Ser Met Lys Arg

185 190 195

ctt aac agc ctt ctc aat atc cca gaa aag tgt cct gaa cag gga ggg 740

Leu Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Glu Lys Cys Pro Glu Gln Gly Gly

200 205 210

atg att tgg aag ata tct gaa gat aaa cag cta gca gtt tgc ctg aaa 788

Met Ile Trp Lys Ile Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala Val Cys Leu Lys

215 220 225

tat gct gga gta ttt gca gaa aat gca gaa gat gct gat gga aaa gat 836

Tyr Ala Gly Val Phe Ala Glu Asn Ala Glu Asp Ala Asp Gly Lys Asp

230 235 240

gta ttt aat acc aaa tct gtt ggg ctt tct att aaa gag gca atg act 884

Val Phe Asn Thr Lys Ser Val Gly Leu Ser Ile Lys Glu Ala Met Thr

245 250 255 260

tat cac ccc aac cag gta gta gaa ggc tgt tgt tca gat atg gct gtt 932

Tyr His Pro Asn Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser Asp Met Ala Val



5 / 2 4

265

270

275

act ttt aat gga ctg act cca aat cag atg cat gtg atg atg tat ggg 980

Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Asn Gln Met His Val Met Met Tyr Gly

280

285

290

gia tac cgc ctt agg gca ttt ggg cat att ttc aat gat gca ttg gtt 1028

Val Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Ile Phe Asn Asp Ala Leu Val

295

300

305

ttc tta cct cca aat ggt tct gac aat gac tgagaagtgg tagaaaagcg 1078

Phe Leu Pro Pro Asn Gly Ser Asp Asn Asp

310

315

tgaatatgat cttgtatag gacgtgtgtt gtcattatit gtagtagtaa ctacatatcc 1138

aatacagctg tatgtttctt ttctttttct aatttggtgg cactgglaa accacacatt 1198

aaagtcagta gtacatitit aaatgaggtt ggtttttttc tttaaaacac atgaacatig 1258

taaatgtgtt ggaaagaagi gttttaagaa taataatit gcaaataaac tattaataaa 1318

tattatatgt gataaatit aaattatgaa cattagaaat ctgtggggca catatititig 1378

ctgatttggtt aaaaaatit aacaggtctt tagcgttcta agatatgcaa atgatatctc 1438

6 / 24

tagttgtgaa ttgtgatta aagtaaaact ttt

1471

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Leu Ser Glu Ser Ser Ser Phe Leu Lys Gly Val Met Leu Gly Ser

1

5

10

15

Ile Phe Cys Ala Leu Ile Thr Met Leu Gly His Ile Arg Ile Gly His

20

25

30

Gly Asn Arg Met His His His Glu His His His Leu Gln Ala Pro Asn

35

40

45

Lys Glu Asp Ile Leu Lys Ile Ser Glu Asp Glu Arg Met Glu Leu Ser

50

55

60

Lys Ser Phe Arg Val Tyr Cys Ile Ile Leu Val Lys Pro Lys Asp Val

65

70

75

80

Ser Leu Trp Ala Ala Val Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp Lys

85

90

95

7 / 24

Ala Glu Phe Phe Ser Ser Glu Asn Val Lys Val Phe Glu Ser Ile Asn

100

105

110

Met Asp Thr Asn Asp Met Trp Leu Met Met Arg Lys Ala Tyr Lys Tyr

115

120

125

Ala Phe Asp Lys Tyr Arg Asp Gln Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Arg

130

135

140

Pro Thr Thr Phe Ala Ile Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Phe Leu Leu Lys

145

150

155

160

Lys Asp Pro Ser Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Ile Lys Ser Gly

165

170

175

Asp Leu Glu Tyr Val Gly Met Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Val Glu

180

185

190

Ser Met Lys Arg Leu Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Glu Lys Cys Pro

195

200

205

Glu Gln Gly Gly Met Ile Trp Lys Ile Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala

210

215

220

Val Cys Leu Lys Tyr Ala Gly Val Phe Ala Glu Asn Ala Glu Asp Ala

8 / 2 4

225                      230                      235                      240

Asp Gly Lys Asp Val Phe Asn Thr Lys Ser Val Gly Leu Ser Ile Lys

                    245                      250                      255

Glu Ala Met Thr Tyr His Pro Asn Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser

                    260                      265                      270

Asp Met Ala Val Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Asn Gln Met His Val

                    275                      280                      285

Met Met Tyr Gly Val Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Ile Phe Asn

                    290                      295                      300

Asp Ala Leu Val Phe Leu Pro Pro Asn Gly Ser Asp Asn Asp

305                      310                      315

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

9 / 2 4

&lt;400&gt; 3

gaagatctag aatgcaccac catgagcatc

30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 4

ataagaatgc ggccgctcag tcattgtcag aaccatttg

39

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 67

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

10 / 24

&lt;400&gt; 5

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt agaaggagat agaaccatgc ttctgaaag 60

cagctcc

67

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 6

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaatcattg tcagaaccat

50

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

1 1 / 2 4

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide Sequence

&lt;400&gt; 7

Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro

1

5

10

15

Ser Pro Ser

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 8

gtttgcctga aatatgctgg agtat

25

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

1 2 / 2 4

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 9

caacagccit ctactacctg gttg

24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Probe Sequence

&lt;400&gt; 10

cagaaaatgc agaagatgct gatggaaaag atgta

35

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA



1 3 / 2 4

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 11

agaaatacac tttcgggaa

19

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 12

tgcagtgcta gacafattac

20

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

1 4 / 2 4

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 13

gcctttccigt ccccaagccg ttc

23

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 14

gccccacaga ttictaatgt tc

22

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

1 5 / 2 4

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 15

gtaatcagat tccattggaa gc

22

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 69

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 16

ggggacaagt ttglacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccaatgg ttccgctag 60

tgggacatc

69

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 56

1 6 / 2 4

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 17

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcagtcattt tctgaaccaa ctggag 56

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 948

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(948)

&lt;400&gt; 18

aig gtt tcc gct agt ggg aca tca ttt ttt aag ggt atg ttg ctt ggg 48  
Met Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Phe Phe Lys Gly Met Leu Leu Gly

1 5 10 15

agc att tcc tgg gtt ttg ata act atg ttt ggc caa att cac att cga 96

17/24

Ser Ile Ser Trp Val Leu Ile Thr Met Phe Gly Gln Ile His Ile Arg

20

25

30

cac aga ggt caa act caa gac cac gag cac cat cac ctt cgt cca cct 144

His Arg Gly Gln Thr Gln Asp His Glu His His His Leu Arg Pro Pro

35

40

45

aac agg aac gat ttc tta aac act tca aaa gig ata ctc ttg gag ctc 192

Asn Arg Asn Asp Phe Leu Asn Thr Ser Lys Val Ile Leu Leu Glu Leu

50

55

60

agt aaa agt att cgt gtt ttc tgt atc atc ttt gga gaa tcc gaa gat 240

Ser Lys Ser Ile Arg Val Phe Cys Ile Ile Phe Gly Glu Ser Glu Asp

65

70

75

80

gag agt tac tgg gct gta ctg aaa gag acc tgg acc aaa cac tgt gac 288

Glu Ser Tyr Trp Ala Val Leu Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp

85

90

95

aaa gca gag ctc tac gat act aaa aat gat aat ttg ttc aat ata gaa 336

Lys Ala Glu Leu Tyr Asp Thr Lys Asn Asp Asn Leu Phe Asn Ile Glu

100

105

110

agt aat gac agg tgg gta cag atg agg acc gct tac aaa tac gtc ttt 384

Ser Asn Asp Arg Trp Val Gln Met Arg Thr Ala Tyr Lys Tyr Val Phe

115

120

125

18 / 24

gaa aag tat ggt gac aac tac aac tgg ttc ttc ctt gca ctt ccc act 432

Glu Lys Tyr Gly Asp Asn Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Leu Pro Thr

130

135

140

acg ttt gct gtc att gaa aat tta aag tac ctt ttg ttt aca agg gat 480

Thr Phe Ala Val Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Leu Leu Phe Thr Arg Asp

145

150

155

160

gca tcc cag ccc ttc tat ctg ggc cac act gtt ata ttt gga gac ctc 528

Ala Ser Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Val Ile Phe Gly Asp Leu

165

170

175

gaa tac glg act gtg gaa gga ggg att gtc tta agc aga gag ttg atg 576

Glu Tyr Val Thr Val Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Met

180

185

190

aaa aga ctt aac aga ctt ctc gat aac tct gag acc tgt gca gat caa 624

Lys Arg Leu Asn Arg Leu Leu Asp Asn Ser Glu Thr Cys Ala Asp Gln

195

200

205

agl glg att tgg aag tta tct gaa gat aag cag ctg gca ata tgc ctg 672

Ser Val Ile Trp Lys Leu Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala Ile Cys Leu

210

215

220

aaa tat gca gga gtt cat gca gaa aat gca gag gat tat gaa gga aga 720

19 / 24

Lys Tyr Ala Gly Val His Ala Glu Asn Ala Glu Asp Tyr Glu Gly Arg

225

230

235

240

gat gia ttt aat aca aaa cca atc gca cag ctt att gaa gag gca ttt 768

Asp Val Phe Asn Thr Lys Pro Ile Ala Gln Leu Ile Glu Glu Ala Leu

245

250

255

tct aat aac cct cag caa gta gta gaa ggc tgc tgt tca gat atg gct 816

Ser Asn Asn Pro Gln Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser Asp Met Ala

260

265

270

att act ttc aat gga ctg acc ccc caa aag atg gaa gta atg atg tat 864

Ile Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Gln Lys Met Glu Val Met Met Tyr

275

280

285

ggc ctg tac cgg ctc agg gca ttt gga cac tat ttc aat gac aca ctc 912

Gly Leu Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Tyr Phe Asn Asp Thr Leu

290

295

300

gtt ttc ttg cct cca gtt ggt tca gaa aat gac tga 948

Val Phe Leu Pro Pro Val Gly Ser Glu Asn Asp

305

310

315

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 315

20 / 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

Met Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Phe Phe Lys Gly Met Leu Leu Gly  
1 5 10 15  
Ser Ile Ser Trp Val Leu Ile Thr Met Phe Gly Gln Ile His Ile Arg  
20 25 30  
His Arg Gly Gln Thr Gln Asp His Glu His His His Leu Arg Pro Pro  
35 40 45  
Asn Arg Asn Asp Phe Leu Asn Thr Ser Lys Val Ile Leu Leu Glu Leu  
50 55 60  
Ser Lys Ser Ile Arg Val Phe Cys Ile Ile Phe Gly Glu Ser Glu Asp  
65 70 75 80  
Glu Ser Tyr Trp Ala Val Leu Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp  
85 90 95  
Lys Ala Glu Leu Tyr Asp Thr Lys Asn Asp Asn Leu Phe Asn Ile Glu  
100 105 110  
Ser Asn Asp Arg Trp Val Gln Met Arg Thr Ala Tyr Lys Tyr Val Phe  
115 120 125  
Glu Lys Tyr Gly Asp Asn Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Leu Pro Thr  
130 135 140  
Thr Phe Ala Val Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Leu Leu Phe Thr Arg Asp  
145 150 155 160  
Ala Ser Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Val Ile Phe Gly Asp Leu  
165 170 175



21 / 24

Glu Tyr Val Thr Val Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Met  
180 185 190

Lys Arg Leu Asn Arg Leu Leu Asp Asn Ser Glu Thr Cys Ala Asp Gln  
195 200 205

Ser Val Ile Trp Lys Leu Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala Ile Cys Leu  
210 215 220

Lys Tyr Ala Gly Val His Ala Glu Asn Ala Glu Asp Tyr Glu Gly Arg  
225 230 235 240

Asp Val Phe Asn Thr Lys Pro Ile Ala Gln Leu Ile Glu Glu Ala Leu  
245 250 255

Ser Asn Asn Pro Gln Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser Asp Met Ala  
260 265 270

Ile Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Gln Lys Met Glu Val Met Met Tyr  
275 280 285

Gly Leu Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Tyr Phe Asn Asp Thr Leu  
290 295 300

Val Phe Leu Pro Pro Val Gly Ser Glu Asn Asp  
305 310 315

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

2 2 / 2 4

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 20

gcccaagctt cacagaggtc aaactcaaga ccac

34

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 21

cggaattctc agtcattttc tgaaccaact g

31

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

2 3 / 2 4

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

gccctgaaata tgcaggagtt ca

22

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

ggttattaga caatgcctct tcaataag

28

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

24 / 24

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Probe Sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM

<220>

<221> misc\_binding

<222> (36)

<223> Label MGB-TAMRA

<400> 24

gcagaaaatg cagaggatta tgaaggaaga gatgta

36

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03846

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/12, C12N15/54, C12N9/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/40, A61K31/711, A61K38/00, A61K39/395, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/12, C12N15/54, C12N9/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/40, C12Q1/02, C12Q1/68, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 00/56891 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 28 September, 2000 (28.09.00), SEQ ID NOS: 24, 53 & AU 200039164 A & EP 1210419 A2	1-10, 12-21, 23-25, 27-31/ 11, 22, 26
X/A	WO 99/14328 A2 (GENENTECH, INC.), 25 March, 1999 (25.03.99), SEQ ID NOS: 340, 341 & ZA 9808460 A & AU 9893178 A & EP 1027434 A2 & EP 1114152 A2 & KR 2001024085 A & MX 2000002659 A1 & JP 2001-516580 A & EP 1205489 A1 & EP 1205546 A1 & EP 1205550 A1 & EP 1207168 A1 & EP 1217006 A2 & NZ 503343 A	1-10, 12-21, 23-25, 27-31/ 11, 22, 26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 April, 2003 (18.04.03)

Date of mailing of the international search report  
06 May, 2003 (06.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03846

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 01/04311 A1 (GENENTECH, INC.), 18 January, 2001 (18.01.01), SEQ ID NOS: 340, 341 & AU 200028839 A	1-10,12-21, 23-25,27-31/ 11,22,26
X/A	WO 01/53312 A1 (HTSEQ, INC.), 26 July, 2001 (26.07.01), SEQ ID NOS: 1142, 4714, 2928 & AU 200127284 A & EP 1242443 A1 & US 2002/0197679 A1	1-10,12-21, 23-25,27-31/ 11,22,26
X/A	WO 98/56804 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 17 December, 1998 (17.12.98), SEQ ID NOS: 25, 125 & AU 9880669 A & EP 10423463 A1 & US 6342581 B1 & JP 2002-514090 A	1-10,12-21, 23-25,27-31/ 11,22,26
X/A	WO 02/22660 A2 (HYSEQ, INC.), 21 March, 2002 (21.03.02), SEQ ID NOS: 379, 823 & AU 200190548.A	1-10,12-21, 23-25,27-31/ 11,22,26
X	JU, T. et al., Cloning and expression of human core 1 betal,3-galactosyltransferase, J.Biol. Chem., 2002 January, Vol.277, No.1, pages 178 to 186	1-31
P,X	KUDO, T. et al., Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc(alpha) peptide betal,3-galactosyltransferase(C1Gal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of O- glycan, J.Biol.Chem., 2002 December, Vol.277, No.49, pages 47724 to 47731	1-31

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/09, C12N15/12, C12N15/54, C12N9/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/40, A61K31/711, A61K38/00, A61K39/395, A61K48/00, C12Q1/02, C12Q1/68, A01K67/027

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/09, C12N15/12, C12N15/54, C12N9/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/40, C12Q1/02, C12Q1/68, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 00/56891 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 2000. 09. 28 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:53 & AU 200039164 A, & EP 1210419 A2	1-10, 12-21, 23-25, 27-31 /11, 22, 26
X/A	WO 99/14328 A2 (GENENTECH, INC.) 1999. 03. 25 SEQ ID NO:340, SEQ ID NO:341 & ZA 9808460 A, & AU 9893178 A, & EP 1027434 A2, & EP 1114152 A2, & KR 2001024085 A, & MX 2000002659 A1, & JP 2001-516580 A, & EP 1205489 A1, & EP 1205546 A1, & EP 1205550 A1, & EP 1207168 A1, & EP 1217006 A2,	1-10, 12-21, 23-25, 27-31 /11, 22, 26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 04. 03

国際調査報告の発送日

06.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& NZ 503343 A	
X/A	WO 01/04311 A1 (GENENTECH, INC.) 2001.01.18 SEQ ID NO:340, SEQ ID NO:341 & AU 200028839 A	1-10, 12-21, 23-25, 27-31 /11, 22, 26
X/A	WO 01/53312 A1 (HTSEQ, INC.) 2001.07.26 SEQ ID NO:1142, SEQ ID NO:4714, SEQ ID NO:2928 & AU 200127284 A, & EP 1242443 A1, & US 2002/0197679 A1	1-10, 12-21, 23-25, 27-31 /11, 22, 26
X/A	WO 98/56804 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 1998.12.17 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:125 & AU 9880669 A, EP 10423463 A1, & US 6342581 B1 & JP 2002-514090 A	1-10, 12-21, 23-25, 27-31 /11, 22, 26
X/A	WO 02/22660 A2 (HYSEQ, INC.) 2002.03.21 SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:823 & AU 200190548 A	1-10, 12-21, 23-25, 27-31 /11, 22, 26
X	JU, T. et al., Cloning and expression of human core 1 betal, 3-galactosyltransferase, J Biol Chem, 2002 Jan, Vol. 277, No. 1, p. 178-186	1-31
PX	KUDO, T. et al., Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc(alpha) peptide betal, 3-galactosyltransferase (ClGal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of O-glycan, J Biol Chem, 2002 Dec, Vol. 277, No. 49, p. 47724-47731	1-31